

VU Research Portal

Hoe je van een bacterie chocola kunt maken

Bruggeman, F.J.

2016

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Bruggeman, F. J. (2016). *Hoe je van een bacterie chocola kunt maken*. Vrije Universiteit Amsterdam.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Hoe je van een bacterie chocola kunt maken

prof.dr. F.J. Bruggeman

Hoe je van een bacterie chocola kunt maken

prof.dr. F.J. Bruggeman

Rede in verkorte vorm uitgesproken bij de aanvaarding van het ambt van hoogleraar Interdisciplinary Life Sciences, University Research Chair, aan de Faculteit der Aard- en Levenswetenschappen en aan de Faculteit der Exacte Wetenschappen van de Vrije Universiteit op 29 juni 2016.

Voorwoord over wetenschap

In een brief schreef Isaac Newton in 1676: "Als ik verder ben gekomen, dan is dat staande op de schouders van giganten." ("If I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants."). Hiermee bedoelde hij dat al zijn bevindingen volgen uit bevindingen van invloedrijke wetenschappers voor hem. Isaac Newton was een wiskundige en natuurkundige met een enorme impact, u heeft vast van zijn wetten gehoord tijdens de middelbare school. In Newton zijn tijd waren er maar enkele duizenden wetenschappers, die traag communiceerden via brieven die soms weken onderweg waren. Tegenwoordig bestaat de wetenschap uit miljoenen mensen die razendsnel communiceren via email en internet. Dus ook ik sta op schouders van giganten, enkele van hen bedank ik later.

Ik geniet iedere dag weer van de wetenschap; het geeft voldoening, verrijking, en beantwoordt mijn nieuwsgierige vragen naar de werking van de levende natuur. Ik ervaar het ook als een sociaal proces, waarbij we met elkaar verder komen, door naar elkaar te luisteren, en elkaar op te leiden; zodat wij allen onze plaats in het geheel der dingen beter omvatten, en uiteindelijk een bijdrage kunnen leveren aan een betere wereld. Fantastisch toch?!

De kracht van de wetenschap is dat het rust op een methode, die ‘de wetenschappelijke methode’ wordt genoemd. Redeneringen gebaseerd op emotionele, astrologische of religieuze overwegingen hebben ten slotte nog nooit tot nieuwe technologieën geleidt, wetenschappelijk gefundeerde wel.¹

De wetenschappelijke methode stelt ons in staat de wereld om ons heen op een objectieve manier te bestuderen en uiteindelijk te begrijpen,

door middel van het formuleren, experimenteel toetsen en falsifiëren van hypothesen. De hypothesen die standhouden leiden uiteindelijk tot theorieën die geldig zijn zolang zij niet worden weerlegd. Dat is wat mij betreft de kracht van de wetenschap en tegelijkertijd haar schoonheid.

Wetenschap is niet alleen kil, objectief en methodologisch. Het heeft ook consequenties voor hoe wij de wereld ervaren en wat onze plaats is. Ik denk dat Jacques Monod goed verwoordt wat ik als een schoonheid, én kracht, van de biologische wetenschappen ervaar,

"Het is een noodzakelijk gevolg dat kans ten grondslag ligt aan iedere innovatie, en van al de scheppingen in de biosfeer. Pure kans, zonder enige beperking maar blind, is de wortel van het indrukwekkende bouwwerk van de evolutie: dit centrale concept in de moleculaire biologie is niet langer één van vele mogelijke, of denkbare, hypothesen. Het is vandaag de dag de enig denkbare hypothese, de enige die overeenkomt met observatie en toetsing aan feiten. En niets wijst erop dat we deze overtuiging moeten aanpassen. Er bestaat geen ander wetenschappelijk concept, in geen van de wetenschappen, dat meer destructief is voor antropocentrisme [het centraal stellen van de mens] dan deze." (Jacques Monod, *Chance and Necessity*)²

Veel wetenschappers zullen wellicht niet direct overtuigd zijn van de fundamentele rol die toeval speelt in de natuur. Volgens de huidige wetenschap is ons bestaan echter wel degelijk een aaneenschakeling van toevalligheden. Een fenomeen wordt in dit verband als 'toevallig' opgevat als we niet voldoende kennis hebben om dit fenomeen met een absolute zekerheid te voorspellen. Het verklaren van een fenomeen dat in het verleden plaatsvond is daarom dus ook niet altijd mogelijk. Deze vorm van toevalligheid zou je 'schijnbaar toevallig' kunnen noemen. Dit is anders dan toevallige fenomenen die echt toevallig zijn, die kunnen we nooit met absolute precisie weten. Dergelijke fenomenen zijn beschreven in de quantum mechanica, waar ik het niet over zal hebben.³

De enige werkbare situatie, en pragmatische aanpak, in de biologie is er één waarbij we veel processen als schijnbaar toevallig zullen bestempelen, omdat ik niet verwacht dat we in staat zijn om de noodzakelijke gegevens voor exacte voorspelling experimenteel te verkrijgen.⁴

Veel fenomenen zijn dus toevallig. Ons huidige begrip van de oorsprong van de oerknal wijst op een toevallige oorsprong van ons heelal. Het ontstaan van leven op aarde berust op toeval. (Het had evengoed

op een andere planeet kunnen zijn en dat is waarschijnlijk óók gebeurd.) Het uitsterven van de dinosauriërs berust op toeval. Dit stelde ons, aapachtigen, in staat verder te ontwikkelen. Vele chemische reacties in uw lichaamscellen, en die van bacteriën, berusten op toeval. Dat u hier nu in de zaal zit, mij wel of niet kent, berust op toeval. Mijn levensloop, of de uwe, had even goed anders kunnen zijn.⁵ De rol van toeval – de rol van kansprocessen – zal een belangrijke rol spelen in dit boekje.

In de meeste hoofdstukken zal ik vrij kwalitatief en ‘populair’ over mijn wetenschap schrijven. Dit doe ik omdat ik mij vooral richt tot vrienden, familie en de ouders van promovendi in onze afdeling. Het laatste hoofdstuk is gericht aan de wetenschapper die de details waardeert.

Frank Bruggeman, juni 2016, Rotterdam.

Hoofdstuk 1

Van mens naar bacterie

Uw lichaam bevat zo'n 10×1 miljoen $\times 1$ miljoen cellen. Dit aantal is moeilijk voor te stellen. Het komt overeen met het aantal mensen op een planeet die 1370 maal meer mensen bevat dan onze planeet. Er wonen ongeveer 7.3 miljard mensen op aarde, dat is 7300×1 miljoen.

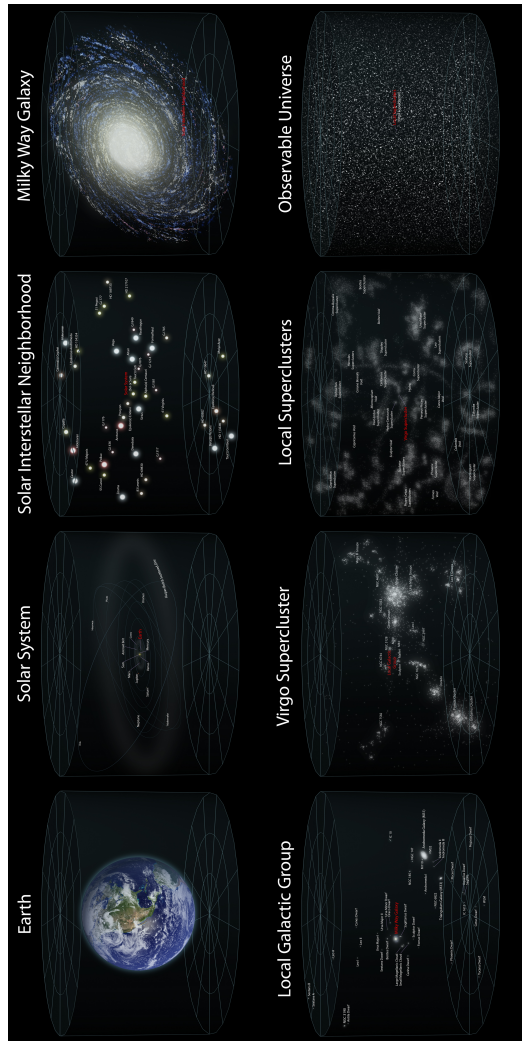
U denkt nu wellicht dat dit hele grote aantallen zijn. Dit zijn het inderdaad, omdat u dergelijke getallen in uw dagelijks leven nauwelijks tegenkomt. Maar in de natuur vinden we ze volop. Het aantal sterren in het heelal – iets groters bestaat er niet – is bijvoorbeeld nog vele malen groter.

Onze planeet aarde draait met enkele andere planeten, zoals Mars en Jupiter, rond de zon, een ster. Tesaamen maken zij een zonnestelsel. Er bestaan zo'n 200 – 400 miljard sterren, zoals de zon, en zo'n 100 miljard planeten, in het sterrenstelsel, de 'Melkweg', waar wij deel van uit maken. Er bestaan zo'n 100 miljard van dergelijke sterrenstelsels in het zichtbare universum. Dus grote getallen komen we vaak tegen in de natuurkunde én de biologie.

Dit astronomische aantal sterren toont ook aan dat wij, de mens, nietige wezens zijn en van weinig betekenis zijn (in het heelal). (We gedragen ons echter ook wel eens anders, helaas.) Stephen Hawking, een zeer bekend sterrenkundige (*The Theory of Everything* is een mooie film over zijn leven), schreef eens:

"We zijn maar een gemiddelde apensoort, op een kleine planeet van een erg gewone ster. Maar we kunnen het heelal begrijpen. Dat maakt ons zeer speciaal." (Stephen Hawking)⁶

Wij stellen dus vrij weinig voor op de schaal van het heelal (figuur 1.1).



Figuur 1.1: Dimensies, afstanden en aantallen van sterren en planeten in het heelal. Zie https://en.wikipedia.org/wiki/Earth's_location_in_the_Universe en https://en.wikipedia.org/wiki/Observable_universe.

Nu weer terug naar de biologie. Stelt u zich eens het volgende voor, om een indruk te krijgen van het aantal cellen waar uw lichaam is opgebouwd: Als u per seconde 1 cel zou kunnen tellen, dan zou u 317.000 jaar tellen voordat u al uw lichaamscellen heeft geteld. Zoveel jaar geleden bestond de huidige mens niet eens, Europa werd toen onder andere bevolkt door Neandertalers; misschien kent u die nog van uw geschiedenisles.⁷

Van het astronomische aantal cellen in uw lichaam is het overgrote deel, meer dan 95%, niet ouder dan 10 jaar. Dus 10 jaar geleden was u een ander mens. Althans, qua moleculaire bestanddelen. Al deze cellen zijn dus nieuw! Kijk eens naar uw hand, al haar cellen, hun moleculaire bestanddelen waaruit de botten, de nagels en het kraakbeen bestaan, zijn dus vernieuwd tijdens de afgelopen tien jaar. Er wordt van alles in uw lichaam continu vernieuwd, gekopieerd, en gerepareerd. Het vernieuwen van cellen gebeurt molecuul voor molecuul. Oude moleculen worden afgebroken. Nieuwe moleculen worden gemaakt. Celvernieuwing, groei, en aanpassing is wat mij betreft één van de wonderen van de biologen die ik graag beter zou willen begrijpen. Bacteriën zijn uitermate geschikt voor dergelijk onderzoek.

Cellen bestaan uit moleculen. Moleculen bestaan uit elementen, zoals koolstof, waterstof, ijzer, zink, etc. Er bestaan 118 elementen in totaal⁸, een groot deel is nauwelijks stabiel en die zal je nooit tegenkomen. Alle elementen, dus ook die waar uw lichaam uiteindelijk uit bestaat, zijn gemaakt in het heelal.⁹

In sterren worden de meeste elementen gemaakt, via een proces dat nucleosynthese heet. Waterstof en helium, de twee lichtere elementen, zijn gemaakt tijdens de geboorte van het heelal, de zogenaamde ‘Oerknal’, toen er nog geen sterren waren. Tevens worden zij gemaakt in kleine sterren, zoals de zon. Tijdens dit proces wordt de warmte van de zon genereerd die al het leven op het aarde mogelijk maakt. Grotere sterren maken de zware elementen. Omdat wij uit elementen bestaan die in sterren worden gemaakt, zijn wij dus allen eigenlijk ‘sterrenstof’!

Uw lichaam bevat ongeveer 10 maal zoveel bacteriële cellen dan menselijke cellen dat is zo’n 1 kilo van uw lichaamsgewicht. Bacteriën zijn ééncellige organismen. Zij zijn de simpelste zichzelf-instandhoudende levensvorm op aarde. Zij hebben al de eigenschappen die we levende organismen toedichten. Als je het leven wilt begrijpen dan begin je dus logischerwijs bij de simpelste levende eenheid: een bacterie. Bacteriële cellen hebben met menselijke cellen gemeen dat ook zij zich kunnen vernieuwen, groeien en aanpassen.

Bacteriën bestaan uit dezelfde soorten moleculen als uw lichaamscellen. Een groot deel van hen komt vrijwel exact overeen; bijvoorbeeld de moleculen die betrokken zijn bij metabolisme – het opnemen en verwerken van weer andere moleculen die worden omgezet in nieuwe cellulaire bestanddelen.

Jacques Monod, een moleculair bioloog en Nobelprijswinnaar, en een beetje mijn wetenschappelijke held, schreef ooit: "Wat waar is voor *E. coli* is ook waar voor de olifant." *E. coli* is een bacterie die op dit moment in uw darm voorkomt, en die door veel biologen wordt bestudeerd, omdat deze zo makkelijk hanteerbaar is. Monod bedoelde met deze uitspraak dat alle organismen veel moleculaire mechanismen met elkaar gemeen hebben en dat studies aan *E. coli* ons ook iets vertellen over de olifant en dus ook de mens.

Ik zal het vooral over bacteriën gaan hebben, en uitstapjes maken naar andere organismen, zoals de mens. Over de olifant zal ik het niet meer hebben.

Hoofdstuk 2

Bacteriën: overal, onzichtbaar, opmerkelijke daden

"De moleculaire biologie heeft laten zien dat zelfs het eenvoudigste levende systeem vandaag de dag op de wereld, bacteriële cellen, verschrikkelijk ingewikkelde dingen zijn. Alhoewel de kleinste bacteriën ongelooflijk klein zijn, ze wegen minder dan 10^{-12} gram, is iedere cel eigenlijk een micro-miniatur fabriekje, die uit duizenden ingenieuze moleculaire machientjes bestaat, die allen weer bestaan uit honderdduizend miljoen atomen, dit alles is veel complexer dan enige machine gemaakt door mensen en is absoluut zonder weerga in de niet-levende wereld." (Michael Denton, *Evolution: A Theory In Crisis*)¹⁰

Bacteriële cellen zijn veelal niet met het blote oog zichtbaar, toch komt geen enkel door de mens gebouwd apparaat of machine dichtbij de mate van complexiteit van een bacteriële cel. Ook hebben zij eigenschappen die we nog in geen enkel apparaat of machine vinden. Dat is niet omdat die eigenschappen niet nuttig zijn, maar omdat we het nog niet na kunnen maken. Wij begrijpen hen dus nog onvoldoende. Bacteriën kunnen zichzelf namelijk vermenigvuldigen, aanpassen aan nieuwe omgevingen en zichzelf repareren; allemaal eigenschappen die zeer nuttig zouden zijn voor bijvoorbeeld auto's, vliegtuigen of mobiele telefoons.

Wellicht denkt u nu dat bacteriën heel zeldzaam zijn, juist omdat zij zo ingewikkeld samengesteld zijn. Niets is minder waar! Vrijwel alle locaties op aarde zijn bevolkt door bacteriën; je vindt ze echt overal!

Wij zijn ook erg van bacteriën afhankelijk. Grofweg 1 kilo van uw lichaamsgewicht is bacteriële celmassa. En veel van ons voedsel is het resultaat van bacteriële activiteit, zoals bier, kaas, yoghurt en brood. Veel processen op aarde worden uitgevoerd door bacteriën, zoals het recyclen van de elementen koolstof en stikstof. Zonder bacteriën zouden wij dus niet bestaan.

Bacteriën waren al ver voor ons bewoners van de Aarde. Zij zijn onze evolutionaire voorouders. Zij zijn zelf zo'n 3.5 miljard jaar geleden ontstaan. Eén miljard jaar na het ontstaan van onze planeet, Aarde. Terwijl de eerste mensachtigen er nog maar enkele miljoenen jaren zijn. Wij, *Homo sapiens*, bestaan als soort nog maar 100.000 jaar. Terwijl de aarde en de zon zijn gevormd door zwaartekracht, die inwerkte op een immens grote disk-vormige gas en stofdeeltjes wolk, zijn wij het resultaat van evolutie, een hele andere 'natuurkracht', een biologische.

U bent zeer bekend met de daden van bacteriën, ook al realiseert u zich dit misschien niet.¹¹ Zij zijn verantwoordelijk voor alcohol en bubbels in uw bier en champagne. De alcohol en het bubbelende gas CO₂ wordt door bacteriën gemaakt tijdens de fermentatie van suikers. Hetzelfde CO₂ maakt de gaten in Zwitserse kaas. Door bacteriën geproduceerde enzymen verbeteren de werking van uw wasmiddel. De gassen die wij in onze darmen produceren hebben ook een bacteriële oorsprong. Wij maken hoofdzakelijk waterstofgas en een beetje van het gas methaan. De grootste methaan producenten zijn de bacteriën in de magen van koeien. Ik noem dit omdat methaan een gas is dat bijdraagt aan de opwarming van de aarde. De niet zichtbare bacteriën hebben dus een invloed op de schaal van de gehele planeet! Wellicht heeft u ook wel eens rotte vis geroken? Deze geur wordt gemaakt door bacteriën in de schubben van vissen die in afwezigheid van zuurstof, tijdens energiewinning, het stinkende stofje trimethylamine uit trimethylamine N-oxide maken. Zoetwater vissen stinken trouwens niet, want zij bevatten veel minder trimethylamine N-oxide. Wellicht heeft u ook wel eens opgemerkt dat op het strand, vlakbij de branding, net onder het bodemoppervlak, de kleur van het zand zwart is en dat het stinkt naar rotte eieren. Beide zijn het gevolg van bacteriën die van sulfaat, dat wordt aangevoerd door de zee, waterstofsulfide maken, dat ruikt naar rotte eieren en dat zwart kleurt als het metaalionen bindt. Bacteriën: we kunnen niet zonder hen!

Nu u die wonderlijke bacteriën een beetje beter kent, zal ik het in

meer detail over hen gaan hebben.

Hoofdstuk 3

Evolutie, bacteriën en toeval

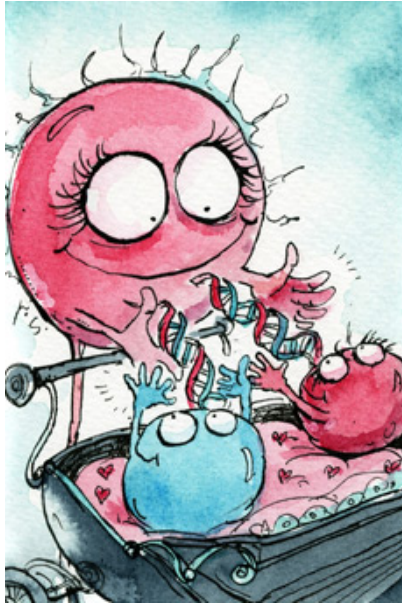
"Draai en aanschouw het 'vreemde'." (David Bowie)¹²

Eén van de wonderen van de biologische evolutie is dat het stapsgewijs, en tergend langzaam, heeft geleid tot een enorme complexiteit aan levende organismen vanuit de chemische elementen aanwezig op aarde, de fysische wetten en energie, aangeleverd door de zon.

Het oog, het brein, koloniën van sociale mieren, de menselijke samenleving, en bacteriën: dit alles is spontaan ontstaan, zonder vooropgesteld plan, zonder leider, en dus ook zonder doel. Tevens is het grotendeels een kansproces. Ook de vorming van ons heelal, ingeleid door de oerknal, en de vorming van de aarde en de zon, gebeurde spontaan. Allemaal logische gevolgen van fysische wetten en toevalligheden.¹³

Het evolutionaire kansproces heeft ook geleid tot bacteriën. En dit zijn uitzonderlijk ingenieuze 'machientjes', ik vind ze razend interessant. Ik noem een bacterie een machientje, niet omdat het op een machine, zoals een stoomtrein lijkt, maar omdat zijn werking te begrijpen valt in termen van zijn bestanddelen en hun wisselwerkingen, zoals wij ook stoommachines begrijpen. Beide bestaan uit onderdelen, die op een bepaalde manier gerangschikt zijn en tezamen mechanismen vormen, die tot gedrag leiden. Een stoomtrein genereert kracht en rijdt, terwijl een cel zichzelf vernieuwt, groeit, en zich aanpast. Een cel is echter vele malen complexer dan een stoommachine.

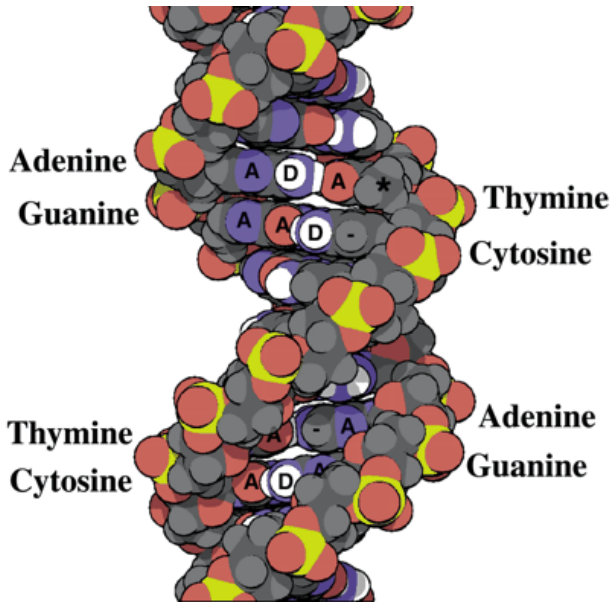
Bacteriën maken, zoals wij, nakomelingen, echter op een veel saai-



Figuur 3.1: **Dochtercellen ontvangen een DNA kopie van de moedercel.** Dit figuur komt uit het blad *The Economist* ('A strand apart', 14 januari, 2010).

ere manier. Over het algemeen vermenigvuldigen zij zich door zich in tweeën te splitsen. De splitsing van één 'moedercel' leidt dan tot twee 'dochtercellen'. Na haar geboorte was deze moedercel zelf een dochtercel. Sinds die tijd heeft zij zich verdubbeld in volume en inhoud, zodat zij na splitsing twee dochtercellen teweegbrengt die vrijwel identiek zijn aan de moedercel tijdens háár geboorte. De dochtercellen hebben dan een kopie van het DNA van de moedercel ontvangen (zie figuur 3.1).

Tijdens dit proces van verdubbeling wordt ook het DNA (figuur 3.2) verdubbeld door middel van een kopieerproces, dat replicatie heet. Tijdens dit proces worden er kleine foutjes in het DNA geïntroduceerd. Dit is grotendeels onvermijdelijk. Deze foutjes leiden tot DNA variatie in populaties van bacteriën en kunnen ertoe leiden dat individuele bacteriën verschillen in hun eigenschappen en gedrag. Dochtercellen zijn dus niet exact identiek aan moedercellen. Het DNA van uw kinderen is ook niet identiek aan dat van u.¹⁴



Figuur 3.2: Een deel van een DNA molecuul. DNA is een streng van 4 verschillende nucleotiden, moleculen: adenine (A), cytosine (C), guanine (G) en thymine (T). De volgorde van deze nucleotiden bepaalt uiteindelijk de eigenschappen van eiwitten, zoals enzymen. Zie: <http://theoncologist.alphamedpress.org/content/5/1/81.full>. DNA dat mutaties bevat heeft een verschillende nucleotide volgorde, dan zijn niet-gemuteerde variant: nucleotiden kunnen zijn veranderd, toegevoegd of verwijderd. Mutaties gebeuren tijdens replicatie of door mutagenen, zoals UV-straling of chemische stoffen.

Welke foutjes optreden tijdens DNA replicatie is een kansproces, zij liggen niet van te voren vast. Wij kunnen ook niet voorspellen welke mutaties dit zullen zijn. Welke bacteriën dus uitgerust worden met net iets gunstigere eigenschappen, waardoor zij uiteindelijk de populatie zullen gaan overheersen, ligt dus ook niet vast. Tevens hangt de identiteit van de uiteindelijk winnende bacterie, met het best aangepaste DNA, van omgevingsfactoren af, waar de bacterie geen invloed op heeft, en ook die factoren zijn over het algemeen onderhevig aan toeval.

Het DNA molecuul van *E. coli* bestaat uit 4.6 miljoen nucleotiden,

is 1.5 mm lang, en codeert voor 4500 genen, die ieder voor een eiwit coderen. Zo'n 250 genen zijn minimaal nodig voor de synthese van een cel vanuit nutriënten (<http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.genom.1.1.99>). Omdat DNA uit vier nucleotiden – moleculen – bestaat, die ieder met één letter worden afgekort (A, T, G of C), kan de DNA sequentie van een *E. coli* cel worden beschreven als één lang ‘woord’, dat bestaat uit 4.6 miljoen letters uit een 4-letterig alfabet. Een boek met de volledige DNA code van *E. coli*, dat dezelfde paginagrootte heeft als dit boek, waarop 1895 letters per pagina passen, zou uit 2428 pagina's bestaan!

Om u een idee te geven van een DNA code: HNS is een DNA bindend eiwit in *E. coli*, het gen dat codeert voor dit eiwit heeft de volgende DNA sequentie (414 nucleotides): ttattgcttg atcaggaaat cgtcgaggga ttaccttgc tcatccattg cttttttgat tacagctgga gtacggccct ggccagtcca ggttttagtt tcgc-cgtttt cgtcaacgta gctatatattt gccggacgct gagcacgctt agctttggtg ccagatt-taa cgcgagcaag gctattcagc agttcggtcg ggtcaatacc gtcagcgatc agcatttcgc gatattgctg cagtttacga gtgcgctctt caacttcagc agcagccgcg ctttctctt cgcg-acgttc gttaacaaca acttctaatt ttccagcat ttcttcagc gtttcaagt tacattctct tgcctgcga cgaagagtac ggatgttggt cagaatttta agtgcctcgc tcat.

Het samenspel tussen celgroei, omgevingsfactoren en de DNA variaties in bacteriële populaties is al sinds een lange tijd een belangrijk onderwerp binnen de biologie. Dit onderwerp vind ik ook zeer interessant en aspecten ervan zullen nog herhaaldelijk in dit boekje terugkeren.

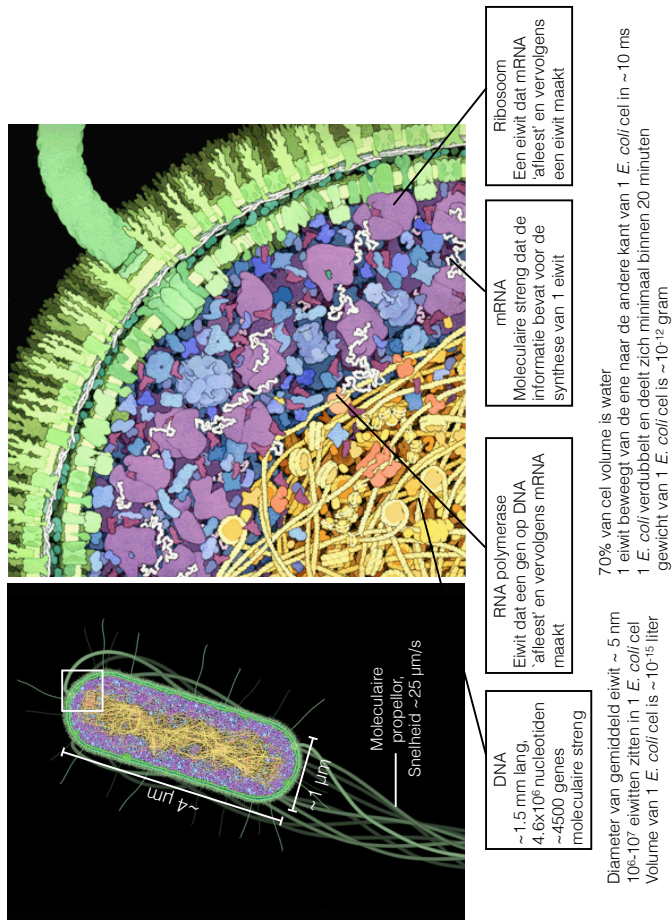
Hoofdstuk 4

E. coli, een bacterie, u vindt haar in uw darm

Ik wil u graag voorstellen aan *Escherichia coli* (figuur 4.1). U vindt haar vrijwel in ieder moleculair biologisch lab. Zij is een gewone bacterie. Zij is zeer klein. 1000 *E. coli*'s op een rijtje is gelijk aan 1 mm. 1 miljoen van hen dus aan 1 meter. Als je haar voedt met het juiste, voedzame voedsel dan deelt zij zich iedere 20 minuten in tweeën, en haar twee dochters op hun beurt, ook hun 4 dochters, en de 8 die daar op volgen, etc. Iedere generatie, dus iedere 20 minuten, verdubbelt het aantal cellen. Met deze snelheid heeft *E. coli* binnen zo'n 15 uur evenveel nakomelingen gemaakt als het aantal cellen dat uw lichaam bevat; en dit was het aantal dat u 317000 jaar zou kosten om te tellen, weet u nog?

Deze gigantische toenamesnelheden illustreren waarom bacteriën zo snel evolueren, en dat is soms best een probleem. U heeft vast wel eens van antibiotica-resistente bacteriën gehoord. Deze zijn onder andere ongevoelig voor antibiotica omdat zij specifieke DNA mutaties bevatten die hen antibiotica resistent maken. Omdat er tijdens iedere celdeling nieuwe mutaties in DNA ontstaan, en omdat er zoveel bacteriën zijn, en mensen die hen bevatten, is de kans vrijwel 1 dat er altijd een resistente bacterie tegen ieder antibioticum zal ontstaan. Het is gewoon wachten totdat deze de kop opsteekt. Het is niet anders, het berust allemaal weliswaar op toeval maar dat resistentie altijd zal gebeuren weten we eigenlijk wel zeker.

Hoe snel gaat de evolutie van bacteriën eigenlijk? Stel je een populatie van bacteriën voor die uit 1 miljoen plus 1 bacteriën bestaat. Die



Figuur 4.1: Enkele specificaties van een *E. coli* cel. Zie de website van David Goodsell, <http://mgl.scripps.edu/people/goodsell/>, die veel tekeningen van biologische cellen en moleculen maakt.

ene die groeit 1% sneller dan de heersende populatie. Het duurt dan nauwelijks een maand, 27 dagen om precies te zijn, voordat de populatie

voor 99% uit de sneller groeiende bacterie bestaat.¹⁵ Best snel dus; zeker als je in acht neemt dat de andere bacterie die 1 miljoen keer vaker voorkwam, ook groeide gedurende deze maand, en maar 1% trager.

‘Biologische evolutie’, wat is dat? Het principe dat ten grondslag ligt aan evolutie is verrassend eenvoudig. Haar gevolgen zijn echter nauwelijks te omvatten. Evolutie heeft geleid tot alle levende wezens op aarde; bacteriën, dinosauriërs, walvissen, bomen, jij en ik, en ga zo maar door. Evolutie leidt tot nieuwe soorten, maar even goed tot het uitsterven van soorten. We kunnen evolutie van bacteriën tegenwoordig goed bestuderen in laboratoria (zie <http://myxo.css.msu.edu/ecoli/>).

In tegenstelling tot veel processen in de natuurkunde en de scheikunde, die veelal wel een wetmatige richting hebben (verhoging van de entropie), is de drijvende kracht achter evolutie niet te beschrijven op een dergelijke wijze. Terwijl evolutie toch echt voortkomt uit moleculaire processen, die onderhevig zijn aan natuurkundige en scheikundige ‘wetten’. Het is de interactie en competitie tussen organismen die de natuurkundige en scheikundige wetmatigheid zodanig verstoort dat het de effecten van entropie teniet doet. Concepten zoals reversibiliteit en evenwicht, die zo krachtig zijn in de natuur- en scheikunde, zijn eigenlijk niet van toepassing op evolutie. Evolutie is een dynamisch proces dat ver van evenwicht plaats vindt.

Kans speelt een grote rol in soortvorming en soort-verdwijning door evolutie. Evolutie heeft geen richting. Het leidt niet tot complexere, simpelere of intelligentere organismen. Ook leidt het niet tot steeds meer organismen op aarde. En ook niet tot minder. Evolutie is stuurloos en doelloos. Het is de interactie en competitie tussen biologische soorten die uitmaakt welke soorten zullen voortbestaan. Zij laten de meeste nakomelingen achter. Zij kunnen op dit moment succesvol zijn maar later evengoed weer verdwijnen.

Evolutie wordt gekarakteriseerd door een drietal aspecten:

1. *Het ontstaan van DNA mutaties.* Het DNA van ieder organisme is onderhevig aan spontane veranderingen die ontstaan door omgevingsinvloeden (UV-straling, toxische stoffen) en tijdens het proces van DNA kopiëren en recombineren. Tevens wordt het DNA van bacteriën op andere manieren veranderd, zoals het uitwisselen van DNA met andere bacteriën. Deze veranderingen worden mutaties genoemd. Welke mutaties plaatsvinden is een kansproces. Alle cellen in uw lichaam, en alle bacteriële cellen, bevatten dus mutaties. Ook uw eicellen (als u een vrouw bent) of uw spermacellen (als u een man bent) zodat u mutaties doorgeeft aan uw nakome-

lingen. Het zijn deze mutaties die sommigen van ons gevoeliger maakt voor specifieke ziektes. Ook zijn zij verantwoordelijk voor antibiotica resistente bacteriën – een groeiend probleem voor de gezondheidszorg.

2. *Mutaties in DNA leiden tot veranderingen in de eigenschappen van organismen.* Mutaties beïnvloeden de eigenschappen van de eiwitten en kunnen leiden tot een andere interactie en competitie tussen organismen. Specifieke mutaties leiden tot meer nakomelingen en andere tot minder. Indien dit tot te weinig nakomelingen leidt dan zal een organisme uiteindelijk uitsterven.
3. *Natuurlijke selectie van organismen die meer nakomelingen maken dan andere.* Het dynamische proces van interacties en competities tussen soorten leidt automatisch tot beter aangepasten die meer nakomelingen maken dan de minder goed aangepasten. Dit proces houdt in principe nooit op en zal altijd de soorten rijkdom op aarde veranderen en vorm geven. Tenzij wij iets ongelooflijks stoms doen, zoals een kernoorlog of anderszins het ecosysteem van de aarde een te grote klap toebrengen. Zelfs dan zullen enkele bacteriesoorten hoogstwaarschijnlijk overleven en wij niet.

Kans ligt dus ten grondslag aan evolutie. Het bepaalt welke mutaties plaatsvinden en dus ook welke organismale eigenschappen veranderen. Vervolgens bepalen deze eigenschappen ten opzichte van die van andere concurrerende soorten welke soort de meeste nakomelingen maakt. Die soort wordt dus ‘geselecteerd’ en zal voortbestaan. Dit proces heet natuurlijke selectie.

Selectie is niet altijd de reden waarom soorten ontstaan en verdwijnen. Soms is ook puur toeval een mechanisme, dit wordt genetische drift genoemd. Of drift of selectie belangrijker is hangt van een aantal factoren af die ik niet zal toelichten.

Evolutionaire argumenten zijn vaak verklarend voor bacteriële gedrag en dergelijke redeneringen zullen enkele malen worden gebruikt in dit boekje.

Nu weet u ook wat er met evolutie grofweg wordt bedoeld.

Hoofdstuk 5

Interdisciplinaire levenswetenschappen

"Vrijwel alle aspecten van het level komen voort uit moleculaire activiteiten, en zonder een begrip van moleculen kunnen we alleen ruw begrip van het leven zelf hebben." (Francis Crick)¹⁶

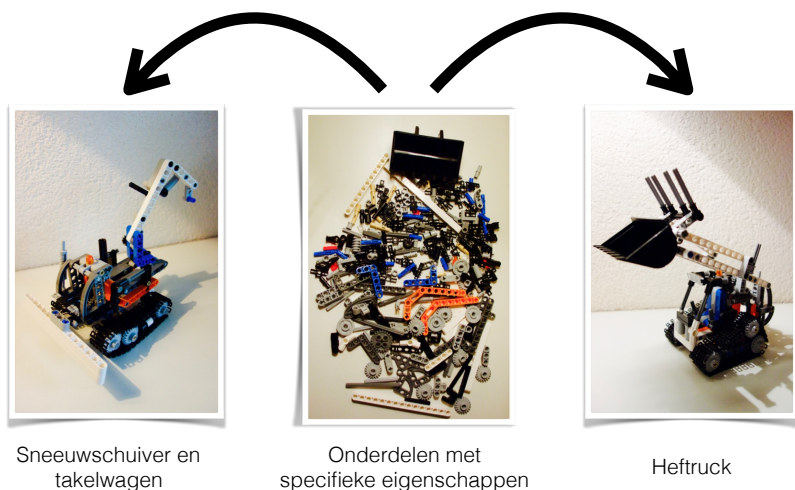
"U zou kunnen zeggen dat al het genetische en moleculaire werk van de afgelopen zestig jaar kunnen worden opgevat als een lang voorspel... Nu we deze periode achter de rug hebben, zijn we weer terug bij af – terug bij de problemen, ... die zijn blijven liggen. Hoe regenereert een gewond organisme zich tot de dezelfde structuur? Hoe vormt een ei een organisme?" (Francis Crick)¹⁷

Een levende cel is uiteindelijk een moleculair systeem. Echter kennis van haar moleculaire bestanddelen alleen draagt maar gedeeltelijk bij aan begrip van hoe een levende cel werkt en waarom zij zich gedraagt zoals ze doet. Het begrijpen van levende organismen is niet alleen een (moleculair) biologische aangelegenheid, het vereist vrijwel alle natuurwetenschappelijke disciplines. Het betreft *Interdisciplinaire Levenswetenschappen*, de titel van mijn leerstoel. Ik zal u uitleggen waarom.

Stelt u zich eens een Lego heftruck voor. Als we willen bepalen wat het maximale gewicht is dat deze heftruck kan tillen, zodat het net niet kantelt, dan hebben we niet veel aan een lijst met de vormen van Lego blokjes waaruit deze heftruck bestaat. We moeten weten hoe deze Lego

blokjes zijn gerangschikt in de heftruck, en liefst doen we een kantelproef met de heftruck.

Als de heftruck kantelt, door een te zwaar hefgewicht, dan zal zij dit doen rond de voorwielen. De voorwielen zijn dus het kantelpunt. Het motor- en tegengewicht van de heftruck, aan de andere kant van de te-heffen-last, bepaalt dus de maximale waarde van het gewicht dat een heftruck kan heffen zonder dat zij kantelt. Om het kantelgewicht te bepalen van een heftruck dan benaderen we haar eigenlijk als een wip met het voorwiel als het kantelpunt. We plaatsen een gewicht dat gelijk is aan het motor en tegengewicht op de ene stoel en een gelijk gewicht op de andere stoel. Nu is de wip in balans en weten we het maximale hefgewicht van onze heftruck.¹⁸



Figuur 5.1: Kennis over de onderdelen van een systeem alleen is ontoereikend om het systeem te begrijpen. Naast kennis van de onderdelen moet de samenhang tussen de delen, hun precieze interacties, bekend zijn voor kwantitatief begrip van systemen. Met dezelfde onderdelen kunnen namelijk andere systemen worden gemaakt. Tevens kan een specifiek systeem, zoals een heftruck of sneeuwschuiver, op verschillende manieren worden gemaakt, uit dezelfde onderdelen.

Dit voorbeeld toont enkele belangrijke aspecten aan over begrip en wetenschappelijke benaderingen:

1. We gebruikten principes die breder toepasbaar zijn dan op een Lego heftruck. Die principes waren: een wip, tegengewicht, kantelpunt, etc.
2. Tijdens onze verklaring vereenvoudigden we de heftruck tot een wip. Dat was trouwens de verklarende ‘kracht’ van het verhaal, de versimpeling – het ‘model’ – die we altijd associëren met begrip. De verklaring was daarom in het geheel niet in termen van Lego blok eigenschappen, alleen hun relatieve plaatsing en gewicht. Het hadden ook Duplo blokjes of metale onderdelen kunnen zijn.
3. Het wipprincipe, omdat het zo eenvoudig is en de essentie van probleem omvat, is uit te breiden naar een kwantitatief verhaal met massa’s en krachten dat leidt tot een wipproef waarmee het kantelgewicht kan worden bepaald. En uiteindelijk tot een wiskundig model waarmee we heftrucks en kranen kunnen ontwerpen en verbeteren.
4. We maakten aannames:
 - (a) de heftruck zou namelijk niet breken voordat het kantelde,
 - (b) het gewicht van de bestuurder – dat variabel is – doet er niet toe (zij zat bijvoorbeeld op het kantelpunt),
 - (c) etc.

Principes, theorieën, versimpelingen, aannames, en veralgemeniseringen worden dus allemaal gecombineerd tijdens een wetenschappelijke verklaring.

Het begrijpen van levende cellen die louter uit moleculen bestaan is dus niet alleen een moleculaire exercitie. Het is er één die veel meer vereist, en gezien de hoge graad van complexiteit, eentje die vele vakgebieden overschreidt. Het vereist een interdisciplinaire aanpak.

Nu weer terug naar de bacterie.

Hoofdstuk 6

Moleculaire regelsystemen die de groei en stress bestendigheid van bacteriën coördineren

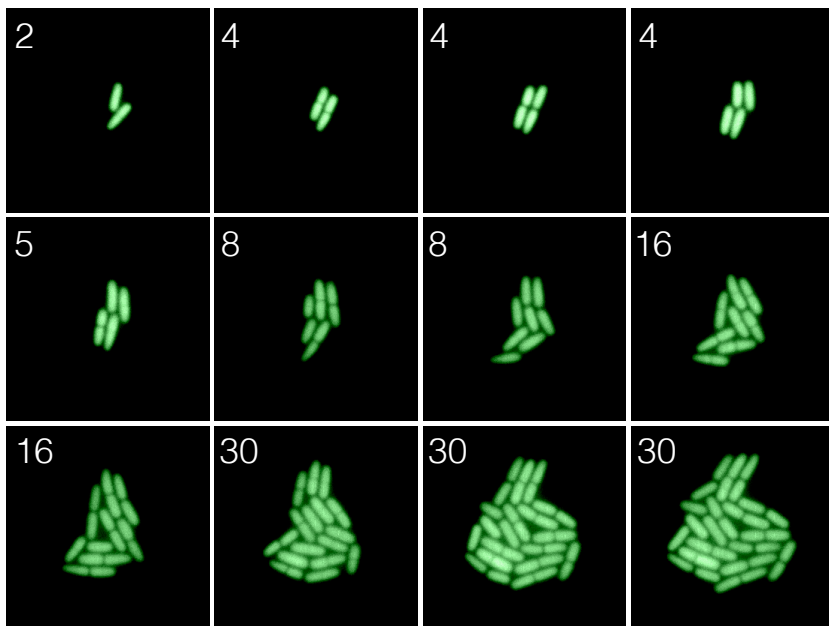
"De droom van iedere cel is om twee cellen te worden." (François Jacob)¹⁹

Succesvolle bacteriën overleven en maken zoveel mogelijk nakomelingen. Celvermenigvuldiging vereist celgroei – volume verdubbeling – gevolgd door celdeling (figuur 6.1). Celgroei vereist de synthese van alle cellulaire bestanddelen, in de juiste proporties.

Wat dient er te worden gemaakt? Datgene waaruit een bacterie, zoals *E. coli*, bestaat. Zoals uw eigen cellen, bestaat zij uit moleculen. Zoals ik al schreef, enkele van uw moleculen lijken op die van haar.²⁰

Wat doen de moleculen waaruit *E. coli* bestaat? Zij zijn verantwoordelijk voor alles dat een bacterie is en doet. Zij voeren gezamenlijk ‘taken’ uit: zoals de omgeving waarnemen, voedsel opnemen, deze omzetten in cellulaire bestanddelen, bewegen, etc. *E. coli* is dus een uiterst complex moleculair systeem. Dit zijn wij trouwens ook.

Bestaat *E. coli* altijd uit dezelfde moleculen? Nee, zij past haar samenstelling aan de huidige condities aan. Hiermee probeert zij te voorkomen dat een andere bacterie meer nakomelingen maakt en haar positie



Figuur 6.1: **Illustratie van bacteriële groei.** Individuele *E. coli* cellen zijn groen gekleurd doordat zij een groen fluorescerend eiwit bevatten. Enkele foto's van de vorming van een bacteriële kolonie in de tijd, door celgroei en celdeling zijn weergegeven. De getallen geven het aantal cellen aan.

overneemt. *E. coli*'s zitten dus nooit stil: hun leven is een continue cyclus van aanpassen, groeien, aanpassen, groeien, aanpassen, groeien, ...

De wijze waarop dit proces van groei en aanpassing werkt is mijn overkoepelende onderzoeksvraag. Mijn onderzoek richt zich op concrete deelvragen van deze hoofdvraag. Omdat dit een algemene biologische vraag is ben ik niet noodzakelijkerwijs beperkt tot één organisme. Werken aan één organisme heeft wel zo zijn voordelen uiteraard, zeker als het experimenteel werk betreft.

Ik zal u kort ons celgroei onderzoek toelichten, zodat u een idee heeft van wat ik bedoel. In het volgende hoofdstuk licht ik ons onderzoek aan celaanpassing toe.

Nu dus celgroei. De hoeveelheid glucose van één suikerklontje is voldoende voor de koolstofbehoefte van 4×10^{12} *E. coli* cellen.²¹ Ongelooflijk

veel bacteriën dus uit 1 suikerklontje. Dit illustreert weer hoe verschrikkelijk klein bacteriën zijn. Het maken van nakomelingen, uit nutriënten, zoals suikers, is de essentie van cel groei en het bestaan van een *E. coli* cel.

We kunnen tegenwoordig zeer nauwkeurige berekeningen maken van de nutriëntbehoefte van cellen. Dit kan met een computermodel dat al de chemische reacties van een cel bevat. Een chemische reactie is de omzetting van specifieke substraat moleculen naar andere product moleculen. Een suikerklontje bestaat bijvoorbeeld hoofdzakelijk uit sucrose moleculen die ieder uit 1 fructose en 1 glucose molecuul bestaat. Een chemische reactie is dan bijvoorbeeld de splitsing van sucrose:

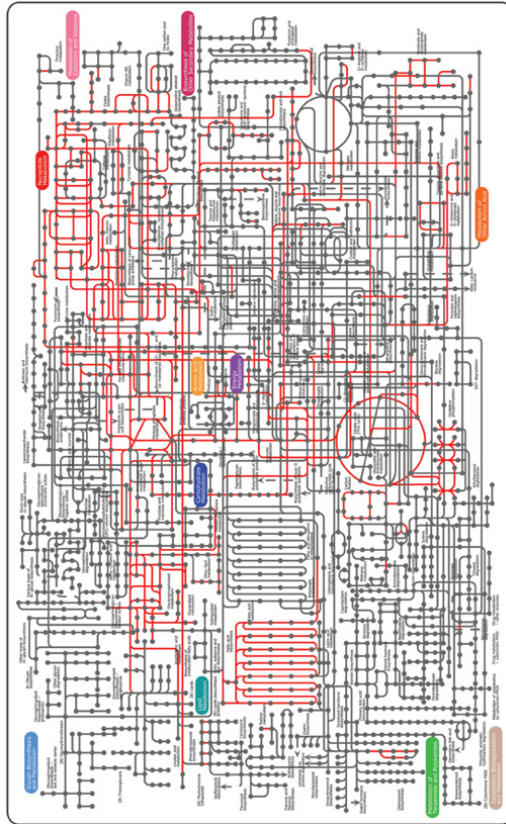


Op deze wijze kunnen we alle reacties die voortkomen in een cel (figuur 6.2) beschrijven in computer model. Een dergelijk model kan dan duizenden reacties bevatten. En vervolgens kunnen we bepalen, door middel van berekeningen, welke nutriënten nodig zijn voor celgroei. Omdat reacties reactanten met elkaar gemeen kunnen hebben, zodat de ene reactie één of meer substraten levert aan de volgende, ontstaan er reactiepaden die nutriënten voor groei verbinden aan cellulaire bestanddelen. Dergelijke paden bepalen we met deze computermodellen.²²

Tevens kunnen we bepalen welke reacties de cel zou moeten uitvoeren om nieuwe cellulaire bestanddelen te kunnen maken in een specifieke omgeving. Omdat het chemische reactienetwerk van een cel zo vertakt is zijn er meerdere reactiepaden die van nutriënten naar alle cellulaire bestanddelen leiden. Wij hebben eens uitgerekend dat er 120 miljoen van die paden bestaan, als *E. coli* groeit op het simpelste groeimedium.²³ Die paden verschillen veelal maar in enkele reacties. Dergelijke paden bevatten ieder rond de 470 reacties. Het totale model bestond uit 2374 reacties. Dus ongeveer 20% van de reacties zijn actief, en onder andere groeiomstandigheden zijn dit weer andere reacties.

E. coli is dus gedurende de evolutie zodanig geselecteerd, met andere woorden, het heeft een specifieke set van mutaties verzameld, zodat het de juiste combinatie van reacties uitvoert. Anders zou deze *E. coli* variant niet meer bestaan. Zij zou de groei van betere varianten niet bij kunnen houden en de evolutionaire strijd verliezen. De wereld is dus ook voor vele *E. coli*'s een oneerlijke, met grote ongelijkheden.

Hoe krijgt *E. coli* het voor elkaar om specifieke reacties uit te voeren en niet andere? Allereerst worden chemische reacties in levende cellen vrijwel allemaal gecatalyseerd door enzymen, dit zijn eiwitten, proteïnen,



Figuur 6.2: **Een vereenvoudigde weergave van het netwerk van chemische reacties van een levende cel.** Het metabolisme van een cel is een netwerk van chemische reacties. Iedere chemische reactie, de lijnen, wordt door een enzym, de cirkels, gekatalyseerd. Het metabolisme zet nutriënten om in alle cellulaire bestanddelen, om celgroei en celreparatie mogelijk te maken. Het metabolisme van *E. coli* bestaat uit meer dan 2000 enzymen, waarvan zo'n 10% minimaal noodzakelijk is voor groei. Als de omgevingscondities veranderen dan verandert *E. coli* haar metabolismenetwerk zodat zij nieuwe reacties kan uitvoeren. Dit doet zij door de bijbehorende genen te activeren.

grote moleculen. Het DNA van *E. coli* bevat de code voor de constructie

van enzymen. Dergelijke codes, sequenties van DNA, die coderen voor een eiwit, worden genen genoemd. Als een gen wordt geactiveerd dan wordt het eiwit gemaakt en zal de bijbehorende chemische reactie in *E. coli* plaatsvinden.

Om zichzelf in volume en samenstelling te verdubbelen, en alle cellulaire bestanddelen te maken, heeft *E. coli* honderden reacties nodig, hierboven had ik het over 470 reacties. Iedere reactie vereist een enzym.

Enzymen bestaan weer uit aminozuren als bestanddelen, waar er zo'n 20 van bestaan.²⁴ Enzymen die andere reacties katalyseren verschillen in hun aminozuursamenstelling. Genen coderen dus voor aminozuursamenstellingen van enzymen. Genen bevatten die informatie. *E. coli* kan alle aminozuren in principe zelf synthetiseren uit eenvoudigere moleculen, zoals ammonium, sulfaat en glucose.

Omdat alle enzymen uit aminozuren bestaan gaat de synthese van één specifiek enzym ten koste van andere enzymen. De snelheid van de synthese van een specifiek eiwit gaat ten koste van een andere eiwit, als de enzymen en aminozuren, die voor eiwitsynthese nodig zijn, limiterend zijn. Zo werkt het ook in een fabriek die dozen in vrachtauto's zet, als de snelheid van dozen aanvoer groter is dan de snelheid van lopende banden. Nu zal de inzet van meer lopende banden voor specifieke dozen, bijvoorbeeld de rode, ten koste gaan van andere dozen, de blauwe. De capaciteit van de fabriek is dus eigenlijk te laag, zij werkt op maximale capaciteit.

Zo is het ook bij bacteriële cel. Omdat deze per tijdseenheid zoveel mogelijk nakomelingen moet maken, om te winnen van concurrerende bacteriën, moet zij zoveel mogelijk nieuwe eiwitten maken, met haar huidige arsenaal aan enzymen. Efficient gebruik van dit arsenaal, dus de juiste tegelijkertijd gebruiken, is de beste oplossing. Zoals ook alle lopende banden in de op maximale-capaciteit-werkende fabriek worden gebruikt.

Omdat succesvolle bacteriën het hardst groeien, en omdat dit de snelheid van nieuwe cellulaire bestanddelen betreft, gaat het dus inderdaad om de snelheid van eiwit synthese. Een evolutionair succesvolle cel investeert dus zijn bestanddelen in de juiste enzymen zodat zij het snelst groeit. De snelst opererende fabriek verdeelt ten slotte zijn lopende banden optimaal over de te-transporteren dozen.

Een cel die het voor elkaar krijgt om de juiste enzymen tot expressie te brengen vereist een heel ingenieus regelsysteem dat in staat is om te compenseren voor over- en ondermatige eiwithoeveelheden. Hoe een cel dit kan, en hoe een dergelijke moleculaire regelsysteem werkt, is wat wij

op dit moment onderzoeken. Dit doen we niet alleen, maar in samenwerking met wiskundigen.

Hoofdstuk 7

Hoe een bacterie informatie vergaart en zich aanpast aan zijn omgeving

"Wat je ziet is dat de constante dominatie van bacteriën de meest opvallende eigenschap van de geschiedenis van het leven is. (Stephen Jay Gould)"²⁵

Een succesvolle bacterie groeit hard en is stressbestendig. Zij maakt dus veel nakomelingen en zal niet snel overlijden als condities veranderen. Dit vereist dat zij zich kan aanpassen aan haar omgeving, die veelal spontaan en snel verandert. (Denk aan: nutriënten, temperatuur, zuurgraadveranderingen.) Een bacterie is dus zeer weerbarstig. Hoe krijgt een bacterie dit voor elkaar?

Een bacterie lijkt een beetje op een Zwitsers zakmes: met een mes, zaag, schroevendraaier, tandenstoker, schaar en wijnopener. Het kan dus veel. Het heeft ook een ander aspect gemeen met zo'n zakmes: je kan niet alle gereedschappen tegelijkertijd gebruiken. Zo kan een bacterie niet tegelijk groeien op alle mogelijke nutriënten, kan het niet tegelijk resistent zijn tegen alle stressen, en kan het niet tegelijk heel hard groeien en erg stress resistent zijn.

Een bacterie moet keuzes maken. Dit moeten de juiste zijn want anders verliest het de evolutionaire strijd. Dit vereist planning, een strategie, een onbewuste, eentje die is geëvolueerd door middel van een

kansproces van ‘trial-and-error’, waarbij gunstige mutaties zijn geaccumuleerd.

Een cel die zich kan aanpassen moet zijn omgeving kunnen meten, anders kan het niet bepalen wat het juiste gedrag is. Wij hebben zicht, smaak en tast als sensoren. Bacteriën kunnen concentraties van chemische stoffen, temperatuur, en kracht meten. Gegeven die metingen ondernemen bacteriën specifiek gedrag. Zoals bewegen, eten, delen, en rusten.

Ieder meetapparaat waar u bekend mee bent heeft een meetbereik en een eindige nauwkeurigheid. Neem een kwikthermometer. Kwik is het enige metaal dat vloeibaar is bij kamertemperatuur. Zoals de meeste materialen zet het uit bij hogere temperaturen en krimpt het bij lagere temperaturen. Het stolt bij -38°C , dit is dus de ondergrens van de kwikthermometer. De bovengrens is 356°C , het kookpunt van kwik. Tevens is de meetnauwkeurigheid van een kwikthermometer beperkt. De precisie is nauwelijks enkele tienden van één graad. Dit komt omdat het ontwerp van de thermometer wordt bepaald door de prijs en is aangepast aan de beperkte nauwkeurigheid die een normale thermometer vereist. Een fout van $\pm 2^{\circ}\text{C}$ is acceptabel voor de meeste mensen.

Een cel heeft eiwitten als meetinstrumenten. Ook zij hebben een beperkte nauwkeurigheid en bereik. Zij kunnen veelal een verandering meten van een factor 100. Dit betekent niet dat een cel al de metingen van een eiwit kan vertrouwen. Alleen als eiwitten perfect zouden werken zou dit kunnen, maar dat doen ze niet, zoals een kwikthermometer. Meeteiwitten werken niet perfect, zij maken fouten. Onder andere omdat ze meten in een klein volume, dat onderhevig is aan toevallige, spontane veranderingen in de te-meten concentratie, waardoor de meting van het eiwit continu verspringt. Naarmate de concentratie in het meetvolume lager is maakt de cel meer fouten.²⁶ De gemiddelde concentratie zou de beste maat zijn voor de juiste de te-meten concentratie. Meeteiwitten maken ook fouten omdat zij zelf spontaan tussen verschillende meettoestanden springen – bij gelijk blijvende concentratie van de te-meten chemische stof. Cellen kunnen de meetfout verkleinen door het totale signaal van meerdere, onafhankelijke meet eiwitten op te tellen of door langer te meten met 1 meeteiwit.²⁷

Als een cel een aanpassing maakt, dan ‘verwacht’ het dat dit de meest gunstige is. De cel maakt dus een voorspelling, want de aanpassing kan de verkeerde blijken zijn. Er is geen absolute zekerheid. Dit zijn de risico’s waar bacteriën mee om moeten gaan. Hetzelfde geldt voor u: u ziet misschien een regenwolk op www.buienradar.nl maar dat is geen

garantie op regen, het kan droog blijven.

Het overlevingsgedrag van een bacteriën lijkt dus in zekere zin op een kansspel en het doel van de bacterie is zijn winst te maximaliseren. De winst van de bacterie kan worden gezien als zijn kans op overleving en het aantal nakomelingen.

Bacteriën vertonen risico-mijdend kansspel gedrag. Zij spelen 'safe'. Mensen die op paarden wedden, wedden veelal op meerdere tegelijk. Als u geen geld wilt verliezen, en toch gaat wedden, dan moet u uw inzet per paard verhogen naarmate dat paard meer goede prestaties op haar naam heeft staan. Een hoog risico betekent dus wedden op een outsider. Voor de paardenwedder betekent dit verlies of grote winst. Een bacterie kan zulke risico's niet nemen, het moet op veilig spelen, het speelt ten slotte met haar leven! Het moet haar kansen spreiden en zich voorbereiden op condities die waarschijnlijk zijn.

Als een bacterie de toekomst slecht kan voorspellen, omdat ze deze niet volledig kan meten, of als de toekomst drastisch kan veranderen naar een levensbedreigende toestand, dan moet zij er eigenlijk voor zorgen dat haar soortgenoten voorbereidt zijn op andere omgevingscondities. Maar hoe kan dat als al haar soortgenoten hetzelfde DNA hebben en dus in principe hetzelfde gedrag zullen vertonen? De bacterie zou nu gebruik moeten maken van een kansproces, zodat de omgeving aanpassing van iedere soortgenoot met een bepaalde waarschijnlijkheid gebeurt, en niet met zekerheid. We weten inmiddels dat moleculaire processen inderdaad dergelijke kansprocessen kunnen creëren. Fantastisch toch?! Dit is één van de onderwerpen waar wij op dit moment onderzoek naar doen.

Als er zich meerdere aanpassingsopties tegelijk voordoen dan vertonen bacteriën een voorkeur voor het meest competitieve gedrag. Veel bacteriën maken bijvoorbeeld sneller nakomelingen als zij de suiker glucose metaboliseren dan metabolisering van andere koolstof-houdende nutriënten. Dit betekent dat een bacterie die twee koolstof-houdende nutriënten tegenkomt voor die nutriënt moet kiezen waarop zij het hardst groeit. Tevens is de groeisnelheid afhankelijk van de concentratie van nutriënten. Bij lage concentratie blijkt een bacterie in staat om zodanig op mengsels van nutriënten te groeien zodat het het hardst groeit. Dit is recent experimenteel geïllustreerd.²⁸

Bacteriën hebben geen sensoren die hen in staat stellen alle mogelijke condities waar te nemen en een passende actie te ondernemen. Soms is aanpassing dus noodzakelijkerwijs een spontaan fenomeen en omvat alleen een fractie van de cellen in de populatie. Wederom een kansproces dus. Hoe dit precies in verschillende organismen werkt is nog niet he-

lemaal duidelijk. Het mechanisme waarmee bacteriën hun groeisnelheid reguleren lijkt hierbij betrokken te zijn. Wij bestuderen dit mechanisme.

Hoofdstuk 8

Waarom bacteriën met hetzelfde DNA toch kunnen verschillen

Populaties van bacteriële cellen kunnen gemakkelijk uit miljoenen individuele cellen bestaan. Bij een delingstijd van 20 minuten duurt het maar 6.6 uur voordat één bacterie 1 miljoen nakomelingen heeft gemaakt.²⁹ Als de ene bacterie soort dus competeert met de andere dan gaat dit om concurrerende populaties van miljoenen individuen. Tevens duurt het niet lang voordat één harder-groeiende bacterie soort een andere, meer-voorkomende soort eruit competeert. Het kost zo'n 27 dagen voordat één 1%-harder-groeiende bacteriecel evenveel soortgenoten heeft gemaakt als de heersende, 1%-langzamer-groeiende populatie die start met 1 miljoen individuen.³⁰

Omdat bacteriën met zoveel soortgenoten voorkomen kunnen zij ook taken verdelen binnen de populatie. Een klein percentage van hen groeit dan bijvoorbeeld niet, maar verkeert in een rusttoestand, waarin zij zeer resistent zijn tegen levensbedreigende stressen, zoals antibiotica. Die bacteriën maken echter geen nakomelingen dus dit is een competitief risico.³¹ Dit competitieve risico moet op wegen op tegen het competitieve voordeel van overleving tijdens een plotselinge levensbedreigende stressperiode.

Cellen moet dus keuzes maken en kunnen niet optimaal zijn tijdens alle situaties: de ene keuze moet worden afgewogen tegen de andere. Dit

‘afwegen’ doet een bacterie niet bewust, zoals wij dit kunnen. Dit gedrag komt voort uit een geëvolueerd moleculair mechanisme en heeft tot veel nakomelingen geleid in de evolutionaire geschiedenis van de bacteriesoort. Dit verklaart waarom deze soort nog bestaat. Bacterieel gedrag evolueert dus. Ons gedrag is ook geëvolueerd en heeft, onder andere, geleid tot sociale interacties tussen mensen en maatschappijen.³²

Bacteriële populaties gebruiken dus allerlei overlevingsstrategieën die ons verrassend in de oren klinken, omdat wij deze niet gebruiken. Dergelijke populaties kun je het best vergelijken met een heel groot gezin van allemaal één-eiëge gezinsleden. Al die gezinsleden hebben hetzelfde DNA, het zijn klonen van elkaar.³³ Tevens hebben al deze gezinsleden geen gevoel dus als er eentje het loodje legt dan leidt dat niet tot enige emotie.

Het doel van dit gezin is om te overleven en zoveel mogelijk nakomelingen te maken. Als groep kunnen zij allemaal hetzelfde gedrag gaan vertonen, en een plotselinge, levensbedreigende situatie riskeren, of risico spreiden en kleinere groepjes maken van gezinsleden die op andere condities zijn voorbereid. Dit krijgen bacteriën voor elkaar doordat sommige van hun moleculaire processen onderhevig zijn aan toeval. Zo kunnen bacteriën met hetzelfde DNA en groeigeschiedenis wezenlijk van elkaar verschillen.

Kansprocessen blijken dus een heel grote rol te spelen in bacteriële populaties. Een gevolg is dat het vaak niet meer geoorloofd is om over een gemiddelde bacterie te spreken: de heterogeniteit tussen bacteriën kan simpelweg té groot zijn, zelfs als zij het hetzelfde DNA hebben. Dit betekent dat we populaties van bacteriën moeten karakteriseren door hun heterogeniteit in acht te nemen. Dit kan als we aan bacteriën, die in een specifieke toestand voorkomen, een kans toe kennen om hen waar te nemen – dit is eenvoudigweg hun aantal gedeeld door de populatiegrootte. Deze kansen kunnen veranderen in de tijd, omdat sommige bacteriële subpopulaties verschillen in groeisnelheid of omdat sommige bacteriën spontaan veranderen van de ene toestand naar de andere toestand. Beide komen voor in de natuur.

Het bestuderen van bacteriële populaties gaat dus onder andere over het begrijpen van kansen. Een belangrijke vraag is dus waarom sommige moleculaire processen in cellen kansprocessen zijn. Stel u eens het meeste eenvoudige moleculaire proces voor, waarbij een molecuul X wordt aangemaakt en afgebroken,



Of het aantal moleculen X toeneemt of afneemt hangt af van het verschil tussen de aanmaak- en afbraaksnelheden. Wordt er per tijdseenheid meer aangemaakt dan afgebroken dan stijgt het aantal van X en anders daalt het. Omdat u het aantal moleculen kunt tellen, zoals geld, kun je het aantal moleculen van X ook beschouwen als het aantal euro's op uw bankrekening.

Uw bankrekening stijgt als u meer geld ontvangt dan uitgeeft, en daalt als u meer uitgeeft dan ontvangt. Doordat u niet op hetzelfde moment geld ontvangt en uitgeeft zal uw bankrekening continu variëren. Laten we deze variaties *fluctuaties* noemen. Uw bankrekening fluctueert dus in de tijd.

Omdat uw maandelijks uitgaven en inkomsten vooral gedurende een periode van enkele weken variëren is het gemiddelde van uw bankrekeningen goed uit te rekenen op basis van uw bankgegevens over een periode van een jaar. De fluctuaties worden dan 'uitgemiddeld'. Tevens krijgt u een goed inzicht in uw financiële toestand over een dergelijke periode, en wellicht ziet u een trend: u bent misschien netto aan het sparen ondanks enkele fluctuaties door incidentele uitgaven.

Fluctuaties doen zich dus voor omdat aanmaak en uitgaven niet simultaan gebeuren, en omdat zij niet even groot zijn in aantallen euro's. Dit is precies de reden waarom molecuulaantallen in cellen fluctueren: reacties vinden asynchroon plaats en soms vinden opeenvolgend meerdere aanmaak (of afbraak) reacties plaats.

Fluctuaties zijn niet altijd van evenveel belang. Stel: uw gemiddelde uitgaven en ontvangsten zijn 50 euro, en u heeft twee bankrekeningen: rekening A met gemiddeld 100 euro en rekening B met gemiddeld 10000 euro. Veranderingen in rekening A zullen altijd groot zijn, want er staat maar 100 euro op en veranderingen zijn rond de 50 euro. Rekening A vertoont dus significante fluctuaties. Rekening B niet, er zijn schommelingen van gemiddeld 50 euro rond 10000 euro en dat is nauwelijks noemenswaardig.

Met andere woorden, moleculaire processen die plaatsvinden met moleculen die in kleine aantallen voorkomen zijn onderhevig aan noemenswaardige, spontane fluctuaties. Deze fluctuaties zijn slecht te voorspellen, want we weten niet precies wanneer aanmaak en afbraakreacties plaatsvinden,³⁴ waardoor er sprake is van een kansproces.

Als er noemenswaardige fluctuaties plaatsvinden in de aantallen van moleculen die een belangrijke sturende rol vervullen in cellen, omdat zij onderdeel uitmaken van regelsystemen, dan kunnen zij ertoe leiden dat een bacteriële cel in een verschillende toestand terecht komt dan een

andere bacteriële cel die deze fluctuatie niet onderging. Het lot van een bacteriële cel is dus onderhevig aan toeval. Toeval steekt dus wederom de kop op. Het verklaart waarom bacteriën met hetzelfde DNA van elkaar verschillen.

Fluctuaties zijn dus onlosmakend verbonden met chemische reacties. Fluctuaties zijn significant voor moleculen die in lage hoeveelheden voorkomen. Het wonderlijke is dat dergelijke schaarse moleculen veelal voorkomen in regelsystemen van bacteriën. Die systemen zijn dus vaak onderhevig aan fluctuaties die leiden tot heterogeniteit in bacteriële populaties van cellen met hetzelfde DNA. Bacteriën bevinden zich dus in een toestand van fluctuatie-gevoeligheid! Dit fenomeen bestuderen wij zelf op dit moment, in meerdere bacteriesoorten.

Hoofdstuk 9

Omgaan met complexiteit door te zoeken naar generieke principes

"Ik denk dat gedurende de volgende 25 jaar biologen een andere taal moeten leren ... ik weet nog niet hoe deze heet; niemand weet dit nog. Maar waar we naar toe gaan is, denk ik, het fundamentele probleem van een theorie van complexe, hierarchische systemen .. – En dit omvat een groot probleem van [organisatie] niveaus: het is wellicht fout om er vanuit te gaan dat al de logica op het moleculaire niveau te vinden is." (Sydney Brenner)³⁵

Begrijpen hoe een bacterie werkt lijkt soms onbegonnen werk. Zij bestaat uit zoveel verschillende moleculen, zoals eiwitten, dat moleculair begrip onmogelijk lijkt. Het DNA van bacteriën bevat namelijk al snel enkele duizenden eiwit-coderende genen. Is moleculair onderzoek aan bacteriën dan uitzichtloos werk?

Inmiddels is de uitdaging niet meer het identificeren van de moleculen waaruit bacteriële en menselijke cellen bestaan. De methoden om dit te doen zijn er en de apparatuur wordt beter, toegankelijker en goedkoper. 'Problem solved.'

De uitdaging is om er achter te komen wat moleculen doen: met welke andere zij interacteren en waartoe dit leidt. Hier zijn wij veel minder goed in op dit moment. Het meten van moleculaire interacties 1-

voor-1 is onbegonnen werk, vanwege het astronomische aantal mogelijke interacties, en ze identificeren in levende cellen is een heel erg moeilijke klus. Een uitdaging dus. (En dat zal het ook nog wel even blijven, verwacht ik.)

Er is echter een andere methode, een methode die niet helemaal moleculair is, maar evengoed de moleculaire basis niet vergeet. Deze methode maakt gebruik van een mix van aanpakken vanuit de wiskunde, natuurkunde, scheikunde en de biologie. De nadruk van de methode ligt op het begrijpen van cellulair gedrag of gedrag van moleculaire systemen die in cellen voortkomen. Begrijpen betekent niet dat dit het begrip volledig is, en dat we tot op de 1ste cijfer na de komma nauwkeurig kunnen reproduceren wat we experimenteel hebben waargenomen. Dit is het doel ook niet.

Het doel is het categoriseren van cellulair gedrag en het identificeren van wetmatigheden – minder sterk: generieke principes – van de onderliggende moleculaire systemen. Bij welk celgedrag horen specifieke moleculaire systemen? Hoe zijn zij opgebouwd? Waarom kunnen zij wel en wat niet? Hoe groot is de klasse van die systemen? Vinden wij dergelijke systemen ook in andere organismen die vergelijkbaar gedrag vertonen? Dit lijkt dus veel meer op theorievorming zoals dit in de natuurkunde gebeurt.³⁶

Theorie, experimenten en wiskundige modellen gaan op een natuurlijke wijze samen in deze methode. Deze methode wordt vaak geassocieerd met ‘systeembioogie’, en als het kleinere systemen betreft met biofysica. Enkele biofysici die nu werkzaam zijn binnen de systeembioogie hebben mij heel erg geïnspireerd de laatste jaren. Dit heeft ertoe geleid dat ik mijzelf al enige tijd aan het bijscholen ben – en hierna vind ik ongetwijfeld weer iets anders. ☺Een wetenschapper is nooit klaar met leren, je weet vrij weinig na je universitaire onderwijsperiode en veel meer, maar nog verbijsterend weinig, zo’n 20 jaar later.

Hoe pak je dat dan aan, zo’n interdisciplinaire methode van modellen, theorie en experimenten? Allereerst vereist dit bekendheid met wiskundige modellen en biologische experimenten. Je ziet dit op dit moment nog meer bij fysici en bio-engineieurs dan bij biologen met een experimentele achtergrond in moleculaire en celbiologie.

Dit is ook wel echt een Nederlands probleem; alleen in Nederland wordt er volgens mij gesproken over een ‘wiskunde-knobbel’. Dit is wel aan het veranderen, maar gaat allemaal nogal traag.³⁷ Tevens is het onduidelijk wanneer interdisciplinair onderwijs moet worden aangeboden, na een bachelor opleiding in een specifieke discipline of vanaf de aanvang

van een bachelor opleiding; hier zijn de meningen nogal over verdeeld.

Iemand die bekend is met wiskundige modellen kan een specifiek moleculair mechanisme, in een ruwe vorm, als een wiskundig model definiëren en er analyses mee doen. Zo kan zij toetsen of haar kennis van het systeem inderdaad leidt tot verwacht gedrag. Zij kan verdere intuïtie verkrijgen over de werking van het mechanisme, experimenten ontwerpen, en hun uitkomsten vergelijken met model resultaten. Dit is zoals het in de meeste kwantitatieve wetenschappen zoals scheikunde, engineering, elektrotechniek, mechanica en natuurkunde werkt, alleen nog maar zelden in de biologie.

Dat moleculaire biologen nauwelijks wiskundige modellen gebruiken blijft mij verwonderen. Vooral omdat biologen de meest complexe systemen op aarde bestuderen, zoals bijvoorbeeld de menselijke hersenen, een menselijke cel of een bacteriecel. De biologieopleidingen moeten op zijn minst enkele vakken wijden aan dergelijke aanpakken om jonge biologen een gevoel te geven van de niet-intuïtieve dynamica van biologische systemen en de kracht van interdisciplinaire benaderingen en samenwerkingen.

Modellen van specifieke moleculaire systemen kunnen vaak vereenvoudigd worden tot een minimaal model.³⁸ Zo'n model beschrijft de essentie van het systeem en is minimaal noodzakelijk voor begrip van een specifiek biologisch-relevant gedrag. Een dergelijk model is uiterst nuttig en er bestaan veel voorbeelden van in de biologie. Belangrijke biologische concepten kunnen worden geïllustreerd met deze modellen, zoals enzym kinetiek, allosterie, cooperativiteit, de werking van negatieve feedback, bacteriële celgroei, biochemische kansprocessen, etc.

Hoofdstuk 10

Chocola maken (voor de wetenschappelijke collega)

"What I cannot 'create', I do not understand." (Richard Feynman)

In de voorgaande hoofdstukken ben ik vrij kwalitatief en 'populair' omgegaan met wetenschappelijke aspecten van mijn onderzoek. Dit deed ik om een breed publiek te bereiken, zoals vrienden en familie van collega's en mijzelf. Ook vind ik het belangrijk dat de ouders van promovendi in onze onderzoeksgroep de kans hebben om het onderzoek van hun kinderen te kunnen begrijpen. Dit hoofdstuk is meer gericht aan mijn wetenschappelijke collega's. Enkele hoofdaspecten van de eerdere hoofdstukken zal ik nu aan de hand van wiskundige modellen toelichten.

Gedragingen van bacteriën, en dus ook de werking van de moleculaire systemen waaruit zij voortkomen, zijn veelal te verklaren in termen van bacteriële fitness, de mate waarin zij groeien en stressbestendig zijn. Ik zal een model voorstellen waarmee we de bacteriële overlevingsstrategieën, die de fitness bepalen, en zich op systeemniveau bevinden, in relatie kunnen brengen met de moleculaire aspecten van de bacterie, het organisatieniveau waarop de mechanismen werken en mutaties plaatsvinden. Ik begin met ons huidige moleculaire begrip van groeisnelheid en hoe een bacterie zijn groeisnelheid regelt. Vervolgens koppel ik dit aan stressbestendigheid, wanneer ik de fitness van een bacterie in wisselende condities bespreek. Alle uitspraken zal ik 'hard' maken in termen van wiskundige relaties, die tezamen een theorie vormen die experimenteel

toetsbaar is.

Neem een bacterie ‘A’ die gebalanceerd groeit. Zij neemt exponentieel toe in aantal met een constante specifieke groeisnelheid, μ_A . De groei vindt in een constante omgeving plaats met een overmaat aan nutriënten. De fitness parameter is nu de groeisnelheid, mits we het organisme dat de meeste nakomelingen nalaat als de evolutionair meest succesvolle beschouwen. Selectie vindt plaats op het niveau van groeisnelheden, want als we bacterie ‘A’ met een andere bacterie ‘B’, die ook gebalanceerd groeit, vergelijken dan vinden we dat $\frac{d}{dt} \ln \frac{n_A}{n_B} = \mu_A - \mu_B$. ‘A’ wint van ‘B’ als $\mu_A > \mu_B$, als zij dus met een hogere specifieke groeisnelheid groeit. Hoe doet A dit? Wat is groeisnelheid vertaald in moleculaire termen?

Om de groeisnelheid te identificeren in moleculaire termen dan is het instructief om met de definitie van de concentratie van een molecuul te starten. We noemen dit molecuul ‘X’. Het heeft als concentratie $c_X = \frac{n_X}{V}$, met molecuul aantal n_X en V als celvolume. Het celvolume neemt toe door celgroei. Tijdens gebalanceerde groei is de concentratieverandering van X nul, $\frac{d}{dt} \frac{n_X}{V} = \frac{1}{V} \frac{dn_X}{dt} - \frac{n_X}{V^2} \frac{dV}{dt} = 0$ dus $\frac{1}{n_X} \frac{dn_X}{dt} = \frac{1}{V} \frac{dV}{dt}$. Als $\frac{1}{V} \frac{dV}{dt}$ een constante is, die we μ noemen, zodat $\frac{dV}{dt} = \mu V$, vindt exponentiële celgroei plaats, met μ als de specifieke groeisnelheid.

Dus tijdens gebalanceerde groei is de specifieke groeisnelheid gelijk aan de specifieke synthese snelheid van ieder molecuul in de cel, want $\frac{1}{n_X} \frac{dn_X}{dt} = \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} = \mu$. Dit betekent dus dat $0 = \frac{dc_X}{dt} = \frac{1}{V} \frac{dn_X}{dt} - \frac{n_X}{V^2} \frac{dV}{dt} = \frac{1}{V} \frac{dn_X}{dt} - \mu c_X$, de aanmaak van moleculen is zodanig dat het de verdunning door groei tegengaat, zodat de concentratie gelijk blijft.

De term $\frac{1}{V} \frac{dn_X}{dt}$ is gelijk aan het netto verschil tussen de snelheden van aanmaak en afbraak reacties van X: $\frac{1}{V} \frac{dn_X}{dt} = \sum_i s_{i,X} v_i$ waarbij v_i de reactiesnelheden zijn (die van concentraties afhangen) en $s_{i,X}$ de stoichiometrische coëfficiënt van molecuul X in reactie i . Die snelheden zijn veelal eigenschappen van enzymen, die weer moleculaire eigenschappen hebben die ‘gecodeerd’ zijn op het DNA van de cel. Dus groeisnelheid in moleculaire termen is gedefinieerd als $\mu = \frac{\sum_i s_{i,X} v_i}{c_X}$. Dit vertelt ons echter nog niet echt wat de groeisnelheid werkelijk is, want we weten van tevoren nog niet wat de concentraties zullen zijn, en dus ook niet hoe snel de reacties zullen verlopen.

Om celgroei te begrijpen veronderstellen we dat de osmotische druk in een cel constant wordt gehouden. Het volume van een cel is nu gelijk $V = \sum_i \phi_i n_i$ met ϕ_i als het molaire volume van molecuul i . De groeisnelheid is gelijk aan $\frac{1}{V} \frac{dV}{dt}$ zodat $\mu = \frac{\sum_i \phi_i \frac{dn_i}{dt}}{\sum_i \phi_i n_i}$. De volumetoename van een cel is dus haar respons op een netto toename in het aantal moleculen

dat zij bevat. Deze toename leidt tot een stijging van de osmotische druk in de cel, waardoor zij water opneemt. De resulterende verhoogde druk op de binnenmembraan van de cel leidt tot meer lipid opname in deze membraan. Op deze wijze compenseert de cel continu de verhoogde osmotische druk. Vervolgens leidt dit tot een hogere ‘macromoleculaire-crowding’ druk in het periplasma, waarna de cel haar peptidoglycaan laag en haar buitenmembraan oppervlak vergroot, om ook deze verhoogde druk tegen te gaan.

Omdat fitness onder constante, nutriënt-rijke condities gelijk is aan de specifieke groeisnelheid moet een evolutionair succesvolle bacterie een hoge groeisnelheid kunnen bereiken door de juiste genen ‘aan te zetten’, die o.a. coderen voor metabolisme enzymen. Vervolgens zullen mutaties leiden tot varianten die een hogere fitness hebben. Om dit beter te begrijpen dienen drie vragen te worden beantwoord: i. wat is de metabolisme toestand die leidt tot groeisnelheid maximalisatie onder constante omstandigheden?, ii. kan een bacterie de toestand van maximale groeisnelheid vinden door middel van het meten van zijn eigen toestand en het sturen van genactiviteit met deze informatie als input?, en iii. hoe verloopt de evolutie van groeisnelheid? De laatste vraag zal ik niet beantwoorden.

Om de metabolisme toestand te bepalen die tot de hoogste groeisnelheid leidt is het nuttig om de definitie van de groeisnelheid in termen van totaal cellulair eiwit te beschouwen. Deze is gelijk aan $\mu = \frac{J_p}{p}$ met J_p als de steady state eiwit productiesnelheid en p als de cellulaire eiwit concentratie. (Immers, $\frac{dp}{dt} = J_p - \mu p$ en is tijdens gebalanceerde groei gelijk aan 0.) De groeisnelheid wordt dus gemaximaliseerd door het metabolisme subnetwerk dat de hoogste eiwitsynthese snelheid, J_p , behaalt, gegeven een cellulaire eiwit concentratie, p , die de hoeveelheid beschikbaar eiwit begrenst dat door de cel kan worden gebruikt. (Een preciezere definitie van de groeisnelheid leidt tot een andere uitspraak, hier werken wij op dit moment aan, en zal ik niet verder analyseren in deze tekst.)

Het optimale metabole netwerk zal dus zo min mogelijk eiwit verspillen. We verwachten ook dat het niet uit heel veel reacties zal bestaan (want reactiesnelheden zijn evenredig met de concentratie van hun katalyserende enzym), dat de reacties erg actief zijn (hoge k_{cat}) en dat het geen redundante reacties zal bevatten.

De optimale route blijkt een ‘elementaire flux modus’ (EFM) te zijn, dit hebben we enige tijd geleden bewezen³⁹. Een EFM voldoet inderdaad aan de bovengenoemde verwachtingen. Een cel heeft echter heel veel EFMs en de optimale hangt van de precieze kinetiek van de enzymen af

die er onderdeel van uit maken.

Er gelden nog andere resultaten in de optimale toestand die inzichtelijk zijn. De optimale EFM behaalt pas de maximale groeisnelheid als alle eiwitten die deze bevat precies de juiste concentratie hebben. Als we de groeisnelheid maximaliseren onder voorwaarde dat de totale eiwit concentratie constant is en bij een vaste waarde van de concentratie van één eiwit i , e_i , dan hebben we afgeleid dat de verandering in de groeisnelheid, door een verandering in e_i , gelijk is aan; $F_i^\mu = \frac{d \ln \mu}{d \ln e_i} = \frac{C_i^J - \frac{e_i}{p}}{1 - \frac{e_i}{p}}$ met $C_i^J = \frac{\partial \ln J}{\partial \ln e_i}$ (response van J op δe_i als p niet constant wordt gehouden; de flux- controle-coëfficiënt van enzym i).⁴⁰ De vergelijking voor F_i^μ correspondeert met de richtingscoëfficiënt van het 1-dimensionale fitnesslandschap, waarbij alle eiwitten hun optimale concentratie hebben behalve 1 (die je bij benadering kunt meten⁴¹, dit wordt op dit moment ook gedaan door een promovendus in ons lab).

De groeisnelheid is dus maximaal als $C_i^J = \frac{e_i}{p}$, dan is namelijk de maximale fitness bereikt, waar $F_i^\mu = 0$. Voor een eiwit dat geen bijdrage heeft aan de groeisnelheid geldt: $F_i^\mu = \frac{-\frac{e_i}{p}}{1 - \frac{e_i}{p}} = -\frac{e_i}{p - e_i}$. De fractie van eiwit dat niet wordt gebruikt bepaald de afname in de groeisnelheid. Dit kun je ook op andere manier afleiden. Al de steady-state fluxen in een metabolisme netwerk verhogen met een factor α als alle eiwit concentraties met α worden vermenigvuldigd, zodat $p \rightarrow \alpha p$, want $v_i \propto e_i$, dus: $\alpha J(p) = J(\alpha p)$. De flux is dus proportioneel met de hoeveelheid gebruikt eiwit, eiwit dat bijdraagt aan de flux. Stel we halen van de gebruikte hoeveelheid eiwit, p , e_i af, dan $J(p - e_i) = J(p(1 - e_i/p)) = (1 - e_i/p)J(p)$ dus de ratio van de flux met ongebruikt eiwit en zonder is $\frac{J(p - e_i/p)}{J(p)} = 1 - \frac{e_i}{p}$. De flux daalt dus linear met de onbenutte eiwit concentratie in het metabolisme. Als de cel ook nog ander nuttig eiwit bevat dat niet bijdraagt aan de metabolisme flux, zoals structureel eiwit, en niet-nuttig eiwit gaat ten koste van metabolisme eiwit, p_m , dan kun je afleiden dat $\frac{J(p - e_i/p)}{J(p)} = 1 - \frac{p_m}{p} \frac{e_i}{p}$. Dit is inderdaad ook precies de relatie die men experimenteel vindt als een niet-nuttig eiwit tot expressie wordt gebracht.⁴²

De vraag die resteert is of een cel ook werkelijk de enzym concentraties in een EFM kan maximaliseren door zijn interne toestand te meten en deze meting te gebruiken om gen expressie te reguleren, zodanig dat de flux per totaal eiwit door een metabolisme route wordt gemaximaliseerd. We hebben op dit moment de indruk dat dit kan. We hebben dit geïllustreerd aan de hand van een realistisch model⁴³ en werken op dit

moment aan een wiskundig bewijs.

Een verhelderend, simpel voorbeeld is het volgende: we nemen een lineaire, metabole route dat 1 variabele metaboliet X bevat (dat concentratie x heeft) en het bevat twee enzymen. Enzym 1 maakt X met snelheid v_1 en enzym 2 breekt X af met snelheid v_2 . Dus in steady state geldt dat $v_1(x_s) = v_2(x_s) = J$ met x_s als de steady state concentratie. We nemen $v_1 = \frac{s}{1+s}e(1 - \frac{x}{s})$ en $v_2 = k(e_T - e)x$. Het doel is om J/e_T te maximaliseren door het variëren van e tussen 0 en e_T . Het maximaliseren van J/e_T is equivalent aan het minimaliseren van $\frac{e_T}{J} = \frac{e_1}{v_1} + \frac{e_2}{v_2} = \frac{1}{\frac{s}{1+s}(1-\frac{x}{s})} + \frac{1}{kx}$. (Dit is trouwens een convex optimalisatie probleem, ook in complexere en realistische gevallen.) In het optimum geldt $\frac{d}{dx} \frac{e_T}{J} = 0$, het oplossen van deze vergelijking voor x leidt tot $x_o = x_o(s)$, met ‘ o ’ subscript als notatie voor een optimale waarde. Dus we hebben nu $J_o(s) = v_1(x_o(s), e) = v_2(x_o(s))$. Deze relatie kunnen we oplossen voor e en dan vinden we een nieuwe relatie $e_o = e_o(s)$. Door s op te lossen uit $x_o = x_o(s)$ vindt je s in termen van x_o , namelijk $s = x_o^{-1}(x_o)$. Invullen in $e_o = e_o(s)$ geeft $e_o = e_o(x_o)$, dit is een nuttige relatie! Het is de optimale input-output relatie van het gen netwerk – zijn waarnemingsrelatie – zodat, voor iedere waarde van s , J/e_T gemaximaliseerd wordt door een optimale aanpassing van e door gen expressie.⁴⁴ Op dit moment ziet het er naar uit dat er voor vrijwel alle metabole netwerken optimale sturingsrelaties met gen netwerken bestaan.

Hoe werkt bacteriële fitness optimalisatie in variabele omstandigheden? De fitness wordt nu geven door de factor waarmee de populatie toe is genomen na een bepaalde periode van omgevingsveranderingen, we nummeren hen van 0 tot n ,

$$\frac{X(n)}{X(0)} = \frac{X(n)}{X(n-1)} \frac{X(n-1)}{X(n-2)} \cdots \frac{X(2)}{X(1)} \frac{X(1)}{X(0)}$$

We nemen aan dat twee verschillende omgevingstoestanden plaatsvinden en dat het organisme ook maar twee fenotypische toestanden kan aannemen, onafhankelijk van de omgevingstoestand – de bacterie neemt de omgeving dus niet waar. Dan hebben we voor de toename factor in omgeving 1, $p_1 e^{\mu_{11}t_1} + (1-p_1)e^{\mu_{21}t_1}$, en voor omgeving 2, $p_1 e^{\mu_{12}t_2} + (1-p_1)e^{\mu_{22}t_2}$, met μ_{ij} als de groeisnelheid van fenotype i in omgeving j , t_j is de duur van omgeving j en p_1 is kans op fenotype 1 ($p_2 = 1 - p_1$). Stel er doen zich N omgevingstransities voor en de kans op omgeving 1 is ρ_1 , dan

$$\frac{X(n)}{X(0)} = (p_1 e^{\mu_{11}t_1} + (1-p_1)e^{\mu_{21}t_1})^{\rho_1 N} (p_1 e^{\mu_{12}t_2} + (1-p_1)e^{\mu_{22}t_2})^{(1-\rho_1)N}$$

De fitness kan nu worden gedefinieerd als,

$$\begin{aligned} F &= \frac{1}{N} \ln \frac{X(n)}{X(0)} \\ &= \rho_1 \ln (p_1 \omega_{11} + (1 - p_1) \omega_{21}) + \rho_2 \ln (p_1 \omega_{12} + (1 - p_1) \omega_{22}) \end{aligned} \quad (10.1)$$

met $\omega_{ij} = e^{\mu_{ij} t_j}$ als de fitness bijdrage van fenotype i aan omgevingsconditie j .

Stel je voor dat fenotype 1 geen fitness bijdrage heeft in omgeving 2 en fenotype 2 ook niet in omgeving 1: dus $\omega_{12} = 0$ en $\omega_{21} = 0$. Dit is een realistisch model voor antibiotica tolerante bacteriën. Zij groeien niet als er nutriënten zijn en overleven tijdens aanwezigheid van antibiotica, terwijl de groeiende bacteriën dood gaan door de antibiotica en groeien in de niet-stress conditie. Het organisme kan nu zijn fitness maximaliseren door p_1 te variëren. Het fitness maximum wordt gekarakteriseerd door $\frac{dF}{dp_1} = 0$. Dit leidt tot een optimale p_1 die gelijk blijkt te zijn aan ρ_1 . Dit heet proportioneel wedden. De optimale bacterie heeft dus een fractie van antibiotica resistente bacteriën die gelijk is aan de kans op een omgeving met antibiotica. Dit is een toetsbare voorspelling.

Hoe kan een organisme zijn fenotypische fractie p_1 veranderen? Stel dat conditie 1 de groei-ondersteunende conditie is en dat 2 de conditie is met de antibiotica aanwezigheid. Om p_1 te kunnen bepalen in termen van celgedrag beschouwen we een eenvoudig model dat celgroei en switchen tussen de twee fenotypen beschrijft (onder condities waar nutriënt aanwezig is),

$$\begin{aligned} \frac{dX_1}{dt} &= \mu_{11}X_1 - k_1X_1 + k_2X_2 \\ \frac{dX_2}{dt} &= k_1X_1 - k_2X_2 \end{aligned}$$

De fenotypische fractie is gedefinieerd als $p_1 = \frac{X_1}{X_1 + X_2}$. We kunnen hier een differentiaalvergelijking voor opstellen in termen van de twee bovenstaanden,

$$\frac{dp_1}{dt} = \frac{X_2 \frac{dX_1}{dt} - X_1 \frac{dX_2}{dt}}{(X_1 + X_2)^2} = k_2 + p_1(\mu_{11} - k_1 - k_2) + \mu_{11}p_1^2, \quad (10.2)$$

deze leidt tot een steady state fractie $p_{1,s} = \frac{\mu_{11} - k_1 - k_2 + \sqrt{(\mu_{11} - k_1 - k_2)^2 - 4k_2\mu_{11}}}{2\mu_{11}}$, die we kunnen vergelijken met de p_1 die voorkomt in de fitness vergelijking 10.1 en is dus gelijk aan ρ_1 als de fitness maximaal is.

De snelheidsconstanten voor fenotype switching, k_1 en k_2 , bepalen dus mede de optimale fracties die de fitness maximaliseren. Ik heb eerder toegelicht hoe een microorganisme zijn groeisnelheid kan variëren, maar welke moleculaire processen bepalen de waarden van de switching snelheidsconstanten, k_1 en k_2 ? Dit hangt uiteraard van de precieze fenotypische switch af. Ik zal het geval van antibiotica tolerantie als voorbeeld nemen. Ik kies voor dit voorbeeld omdat antibiotica tolerantie inductie een directe relatie heeft met groeisnelheid regulatie in *E. coli*, wat ik hierboven heb toegelicht en omdat dit het eenvoudigste voorbeeld is waar we op dit moment aan werken. (We werken ook aan switchen van de groeiomstandigheden van *Saccharomyces cerevisiae* en aan yield/rate-selectie switchen van bacteriën.) Tevens is antibiotica tolerantie gerelateerd aan de tradeoff tussen groei en stressbestendigheid waar ik in eerdere hoofdstukken over schreef.

De inductie van het persister fenotype, dat tolerant is voor antibiotica, gebeurt voor *E. coli* wanneer de ppGpp concentratie in de cel hoog is.⁴⁵ Dit is bij lage groeisnelheid, de ppGpp concentratie daalt namelijk linear met de groeisnelheid in *E. coli*.⁴⁶ Een spontane, grote fluctuatie in de ppGpp concentratie kan ook leiden tot inductie van het persister fenotype.⁴⁷ Als ppGpp stijgt dan verhoogt ook de poly-fosfaat concentratie in de cel, wat de activiteit van Lon protease activeert. Deze protease breekt de antitoxine HipB af, waardoor de vrije HipA (de toxine) concentratie toeneemt (want het komt voor in een complex met HipB). HipA fosforyleert en inactieveert glutamyl-tRNA-synthetase waardoor het ongebonden tRNA, dat normaliter glutamaat bindt, stijgt in concentratie, waardoor het eiwit RelA meer ppGpp produceert.⁴⁸ Dit leidt weer tot meer poly-fosfaat in de cel, etc. Kortom een positieve feedback loop is actief, die netto (in een grove benadering) leidt tot $\xrightarrow{v_s(p)} p \xrightarrow{k_dp}$ waarbij p gelijk is aan de ppGpp concentratie. Dus $\frac{dp}{dt} = v_s(p) - k_dp$ waarbij p zijn eigen synthese activeert. Een dergelijk systeem kan leiden tot bistabiliteit en tot spontaan fenotype switchen als er spontane fluctuaties plaatsvinden in één of meer concentraties langs de causale keten van interacties die ik zojuist beschreef. Als een cel dan in een groeiende toestand is kan een dergelijke fluctuatie de toestand van het systeem in het basin van attractie van de persister toestand brengen waardoor groeiende cellen switchen naar de persister toestand. De kans hierop hangt af van de grootte van het basin van attractie van de groeiende toestand, die hoogstwaarschijnlijk afhangt van de groeisnelheid, omdat de steady state concentratie van ppGpp lineair daalt met de groeisnelheid. Een groeiende cel, die is geswitcht, verandert zijn fenotypische toestand en

wordt een persister. Hoe een persister cel weer terug switcht is moleculair minder goed begrepen op dit moment. De frequenties waarmee celtoestanden van de persister naar de groeitoestand switchen zijn dan een maat voor de switch snelheidsconstanten, k_1 en k_2 , in het bovengenoemde fitness model. De snelheidsconstanten, k_1 en k_2 , zijn dus geen moleculaire parameters maar het zijn emergente tijdschalen van moleculaire netwerken die ten grondslag liggen aan het fenotype switchen. Deze tijdschalen zijn inmiddels geschat op basis van experimentele gegevens.⁴⁹

In dit hoofdstuk heb ik enkele aspecten van mijn onderzoeksaanpak geïllustreerd. Om chocola te maken van het gedrag van een bacterie dienen we dit gedrag eerst te relateren aan de selectiedruk (de omgevingsconditie) die tot dit gedrag heeft geleid. Vervolgens dient het bacteriële gedrag dat de fitness bepaalt, en een systeemeigenschap is, te worden vertaald in moleculaire termen. Nu kunnen we dus op zoek gaan naar de moleculaire netwerken die verantwoordelijk zijn voor fitness maximalisatie. Deze aanpak is direct te koppelen aan experimenten en stelt ons in staat om het gedrag van bacteriën zowel in moleculair-mechanistische als in evolutionaire termen te begrijpen. Tevens is deze aanpak generiek en breed toepasbaar op microorganismen. Deze aanpak is interdisciplinair en leidt tot een natuurlijke samensmelting van theorie, modelleren en experimentatie.

Dankwoord

Ik wil een aantal mensen bedanken die de moeite hebben genomen om dit boekje te lezen en advies te geven ter verbetering. Mede door jullie is dit een toegankelijker boekje geworden: Sandra, pa, Pan, Evelien, Bob en Johan.

Ook wil ik enkele collega's in het bijzonder noemen waar ik al jaren mee samen werk – jullie zijn de giganten waar mijn werk op rust (in willekeurige volgorde): Prof Dr Joost Hulshof, Dr Bob Planqué, Dr Wolfram Liebermeister, Dr Nils Bluethgen, Dr Ralf Steuer, Prof Dr Dorus Gadella, Prof Dr Martine Smit, Dr Joachim Goedhart, Prof Dr Boris Kholodenko, Dr Fred Boogert, Dr Douwe Molenaar, Dr Filipe Santos, Dr Herwig Bachman, Dr Evert Bosdriesz, Dr Meike Wortel, Dr Timo Maarleveld, Dr Maciej Dobrzynski, Dr Joke Blom, Dr Johan van Heerden, Dr Susanne Roth, Dr Anne Doerr, bijna-Dr Mannus Kempe, Dr Pernette Verschure, Dr Wilfred Röling (†), Dr Rob van Spanning, Prof Dr Roel van Driel, Prof Dr Enikő Kallay, Prof Dr Jacky Snoep, Dr Yves Bollen, Prof Dr Leendert Hamoen, en Prof Dr Joen Luirink. En uiteraard alle onderzoekers en ondersteunende staf: Marijke Wagner, Martin Braster, Vera Benavente, Iris Swam en Jeannet Wijker die op dit moment onderdeel uitmaken van de afdeling *Systems Bioinformatics*.

In het bijzonder wil ik mijn voormalige promotor Prof Dr Hans Westerhoff bedanken die veel voor mij mogelijk heeft gemaakt. Ook wil ik Professor Dr Bas Teusink bedanken voor de wijze waarop hij mij steunt, kansen bied en kansen creëert. Bas, alhoewel wij samen op de groepswebsite staan als groepsleider, zie ik dit toch echt als jouw verdienste. Petje af!

Woorden schieten duidelijk te kort als ik mijn trotse ouders en Sandra wil bedanken. Pa en ma jullie zijn fantastische ouders, zonder jullie had ik nooit zo ver gekomen! Pa, als toegewijde en loyale landmeter heb jij mij duidelijk richting de kwantitatieve wetenschap gewezen. Meten is

weten! Ma, jouw onbegrensde begrip en onverstoordbaarheid heeft mij de rust en eigenzinnigheid gegeven die ik nodig heb tijdens mijn onderzoek. Sandra, jouw onvoorwaardelijke liefde, steun en begrip is de constante factor in mijn leven waar ik niet meer zonder kan.

Notes

¹Vele wetenschappers hebben aan die wetenschappelijke aanpak bijgedragen, waaronder Francis Bacon en John Locke. Locke verbleef enige tijd in Nederland.

²"It necessarily follows that chance alone is at the source of every innovation, and of all creation in the biosphere. Pure chance, absolutely free but blind, lies at the very root of the stupendous edifice of evolution: this central concept of modern biology is no longer one among many other possible or even conceivable hypotheses. It is today the sole conceivable hypothesis, the only one that squares with observed and tested fact. And nothing warrants the supposition – or the hope – that on this score our position is ever likely to be revised. There is no scientific concept, in any of the sciences, more destructive of anthropocentrism than this one." (Jacques Monod, *Chance and Necessity*)

³Een schijnbaar toevalling fenomeen is dus in principe dus exact voorspelbaar, mits we met absolute precisie voldoende informatie zouden kunnen verkrijgen. Er zijn waarschijnlijk ook processen die echt toeval zijn. Dergelijke processen kunnen we dus niet door betere metingen en meer informatie met absolute precisie voorspellen. Een voorbeeld van dergelijke processen worden beschreven in de quantummechanica, een natuurkundige theorie – waar ik vrijwel niets van weet. Zie echter: *Quantum mechanics: the theoretical minimum*, Leonard Susskind & Art Friedman, Basic Books; Second Impression edition (February 25, 2014). Dat sommige processen in de natuur worden beschreven als kansprocessen door ons betekent echter niet dat het fundamenteel kansprocessen in de natuur zijn, maar dat wij onvoldoende kennis hebben, of die niet in acht nemen in onze beschrijving van de natuur. (De statistiek en onderliggende fysica van diffusie is hier een mooi voorbeeld van.) Dit werd mooi samengevat door Laplace in 1814, in een overtuiging van een ultiem determinisme,

"We may regard the present state of the universe as the effect of its past and the cause of its future. An intellect [Laplace's Demon] which at a certain moment would know all forces that set nature in motion, and all positions of all items of which nature is composed, if this intellect were also vast enough to submit these data to analysis, it would embrace in a single formula the movements of the greatest bodies of the universe and those of the tiniest atom; for such an intellect nothing would be uncertain and the future just like the past would be present before its eyes." (Pierre Simon Laplace)

De quantummechanica, een natuurkundige theorie, suggereert dat er ook echt fundamentele kansprocessen in de natuur bestaan. Althans dat is mijn lezing, ik ben geen natuurkundige. Als respons op de quantummechanica schreef Albert Einstein ooit: "God does not play dice.". Het artikel door Van Kampen getiteld "Determinism and Predictability" (Synthese, 89, 273-281, 1991) is een aanrader en verduidelijkt de subtiele rol van toeval in de natuurwetenschappen.

⁴Zie bijvoorbeeld Van Kampen zijn analyse in "Determinism and Predictability" (Synthese, 89, 273-281, 1991).

⁵Een belangrijke reden dat ik uiteindelijk de wetenschap verkoos boven andere interesses is denk ik door het kijken naar *Een schitterend ongeluk*, een programme van Wim Kayzer, uit 1993, waarbij zes wetenschappers werden geïnterviewd over hun kijk en bevindingen in de wetenschap. Deze programma's waren werkelijk een openbaring. Tevens heeft het boek van Richard Feynman over licht (*QED: de zonderlinge theorie van licht en materie*, Richard Feynman, Aramith Uitgevers, 1988), aangeraden door mijn natuurkunde leraar een grote impact gemaakt.

⁶ "We are just an average breed of monkeys on a minor planet of a very average star. But we can understand the universe. That makes us something very special." (Stephen Hawking)

⁷De DNA sequentie van Neanderthalers verschilt trouwens maar 0.12% van die van ons. Het DNA van chimpansees en bonobos, apen dus, verschilt zo'n 1% en dat van de gorilla 2%. Zo'n 6 miljoen jaar geleden zijn de evolutionaire takken van mens en de aapachtigen definitief van elkaar gescheiden.

⁸https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_elements

⁹Zie figuur 10.1.

<div><div><div>Big Bang</div><div>Cosmic rays</div></div><div><div>Large stars</div><div>Small stars</div></div><div><div>Supernovae</div><div>Man-made</div></div></div>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Figuur 10.1: **Periodiek systeem van elementen.** De naam van een element staat centraal in ieder vakje en de kleur van het vakje geeft aan welk proces in het heelal verantwoordelijk is voor de synthese van het element. Watershof, *H*, en helium, *He*, zijn tijdens de oerknal – ‘Big Bang’ – gemaakt. Het gewicht van de elementen neemt toe op de volgende manier: van links naar rechts per rij en het gewicht neemt verder toe op de daarop volgende rij.

¹⁰"Molecular biology has shown that even the simplest of all living systems on the earth today, bacterial cells, are exceedingly complex objects. Although the tiniest bacterial cells are incredibly small, weighing less than 10^{-12} grams, each is in effect a veritable micro-miniaturized factory containing thousands of exquisitely designed pieces of intricate molecular machinery, made up altogether of one hundred thousand million atoms, far more complicated than any machine built by man and absolutely

without parallel in the nonliving world."(Michael Denton, Evolution: A Theory In Crisis)

¹¹Zie het boekje *March of the microbes: sighting the unseen* geschreven door John L. Ingraham (The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 2010).

¹²"Turn and face the strange."(David Bowie)

¹³De oerknal lijkt het ultieme kansproces te zijn geweest. Zie: *The inflationary universe: the quest for a new theory of cosmic origins*, Alan Guth, 1997.

¹⁴Uw DNA verschilt van uw kinderen door recombinatie van uw DNA met het DNA van uw partner en door mutaties.

¹⁵De totale populatie van bacteriën bestaan dan uit 7.34×10^{599} . De huidige schatting van het aantal waterstof atomen in ons zichtbare heelal is 10^{82} . Dus dit aantal bacteriën is niet eens mogelijk. De huidige schatting is dat er 300×10^9 sterrenstelsels bestaan, zoals de onze, de Melkweg, met ieder zo'n 400×10^9 stars.

¹⁶"Almost all aspects of life are engineered at the molecular level, and without understanding molecules we can only have a very sketchy understanding of life itself."(Francis Crick)

¹⁷"In one way, you could say all the genetic and molecular biological work of the last sixty years could be considered as a long interlude . . . Now that that program has been completed, we have come full circle - back to the problems , . . left behind unsolved. How does a wounded organism regenerate to exactly the same structure it had before? How does the egg form the organism?"(Francis Crick)

¹⁸Ik weet het, omdat het gewicht stijgt bij een heftruck werkt het iets ingewikkelder, maar een heftruck met scheve lift benadert het 'wip model' vrij nauwkeurig. Ook zal wind en een hellende ondergrond een rol spelen. We zullen er dus iets naast zitten en een veilige marge moeten incalculeren als we het kantelgewicht bepalen. ☺

¹⁹"The dream of every cell is to become two cells."(François Jacob)

²⁰Wij hebben echter meer gemeen met apen, ons DNA blijkt voor 99% gelijk aan die van de chimpansee. Alle organismen vertonen dus enige gelijkenis.

²¹Eén *E. coli* cel heeft 2×10^9 glucose moleculen nodig om een nieuwe cel te maken, zie <http://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?id=100179&ver=8>. Als u een suikerklontje 3 gram weegt en uit puur glucose zou bestaan zou het $3 \frac{\text{gram}}{\text{klontje}} \times \frac{1}{180 \text{ gram}} \times 6 \times 10^{23} \frac{\text{moleculen}}{\text{mol}} = 10^{22} \frac{\text{moleculen}}{\text{klontje}}$ bevatten.

²²Als u zich afvraagt wat het verschil is tussen een wiskundig model en een computer model. Een wiskundig model is een stelsel van vergelijkingen en condities. Een computer model is een wiskundig model plus een bijbehorende algoritme dat een computer in staat stelt met het wiskundige model te werken.

²³<http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1004166>

²⁴Een code van drie nucleotiden in DNA coderen codeert voor één aminozuur. Omdat er maar 4 nucleotiden in DNA voor komen bestaan er $4 \times 4 \times 4 = 64$ 3-letterige codes, meer dus dan het aantal aminozuren. Sommige verschillende 3-letterige codes coderen dus voor het zelfde aminozuur. Zie: https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_codon_table.

²⁵"What you see is that the most outstanding feature of life's history is a constant domination by bacteria. (Stephen Jay Gould)"

²⁶De procentuele fout ϵ in een telling van T duur van n moleculen in een volume van s^3 , die dus in concentratie $c = \frac{n}{s^3}$ voorkomen, is gelijk aan: $\epsilon = \frac{\delta n}{n} = \frac{1}{\sqrt{DscT}}$, met D als de diffusie coefficient van het te-meten molecuul. De levensduur van een molecuul in het volume s^3 , met gemiddelde concentratie c , is $\tau = s^2 D$. Er kunnen

dus $X = \frac{T}{\tau}$ onafhankelijke metingen worden gedaan in dit volume. Zie: *Physics of chemoreception*, Berg & Purcell, Biophysical Journal, 20, 1977, 193-219.

²⁷Dit alles heeft te maken met de kleine lengteschaal waarop de metingen door eiwitten plaatsvinden. Dit zijn enkele nanometers (nanometer=10⁻⁹ meter). Omdat het meet volume van een eiwit, dat grofweg gegeven wordt door de grootte van de bindingsplaats voor de te-meten chemische stof op het eiwit, zo klein is en dus maar enkele moleculen bevat, zelfs als hun concentratie hoog is, zodat 1 of 2 moleculen meer of minder (spontane fluctuaties door diffusie) een groot verschil uitmaken en de nauwkeurigheid van de meting verkleinen. Conformatie fluctuaties van meeteiwitten komt omdat eiwitten continue energie opvangen uit hun omgeving die hen van toestand doet veranderen. Dit is minder voor meeteiwitten die zelf energie spenderen aan conformatie veranderingen.

²⁸Hermen R, Okano H, You C, Werner N, Hwa T, *A growth-rate composition formula for the growth of E.coli on co-utilized carbon substrates*. Molecular Systems Biology, 2015, 11(4), 801, doi: 10.15252/msb.20145537.

²⁹ $10^6 = 1 \times 2^{t/20}$ met de tijd t in minuten, een verdubbelingstijd van 20 minuten en een start populatiegrootte van 1 individu. Dan is de tijd die het kost om 10^6 nakomelingen te maken gelijk aan $t = 20 \frac{\ln 10^6}{\ln 2} \approx 400$ minuten ≈ 6.6 uren.

³⁰De ratio van de heersende populatie en de opkomende populatie is in de tijd gegeven door $\frac{10^6 \times 2^{\frac{t}{20}}}{1 \times 2^{0.99 \times \frac{t}{20}}}$. We willen de tijd weten waarop deze ratio 1 is. Dus

$$\frac{10^6 \times 2^{\frac{t}{20}}}{1 \times 2^{0.99 \times \frac{t}{20}}} = 1 \text{ dus } 10^6 \times 2^{\frac{t}{20}} = 1 \times 2^{0.99 \times \frac{t}{20}} \text{ dus } \ln 10^6 + \frac{t}{20} \ln 2 = \frac{t}{0.99 \times 20} \ln 2 \text{ dus } \frac{\ln 10^6}{t} + \frac{1}{20} \ln 2 = \frac{1}{0.99 \times 20} \ln 2 \text{ en } t = \frac{\ln 10^6}{\frac{1}{20} \ln 2 + \frac{1}{0.99 \times 20} \ln 2} = 36464 \text{ minuten. En } 36464 \text{ minuten} \times \frac{1}{60} \frac{\text{uur}}{\text{minuten}} \times \frac{1}{24} \frac{\text{dag}}{\text{uur}} = 27 \text{ dagen.}$$

³¹ $n(t) = (1-\phi) \times n(0) \times 2^{\frac{t}{t_g}}$ met t_g als de verdubbelingstijd en ϕ als de niet-groeiende fractie. Dus als 5% van de cellen niet groeien, vanaf tijdstip 0, heeft deze populatie altijd 5% minder cellen dan wanneer alle cellen zouden groeien vanaf tijdstip 0.

³²Bacteriën gaan ook interacties met elkaar aan maar hier zal ik het niet over hebben. Het mechanisme dat hiervoor verantwoordelijk is heet 'quorum sensing'. Zie http://www.ted.com/talks/bonnie_bassler_on_how_bacteria_communicate.

³³Als er al mutanten zijn dan zijn dit enkele cellen per mutant genotype, verwaarloosbaar klein dus, als er honderden miljoenen cellen in de populatie voorkomen

³⁴Dit komt omdat dit bepaalt wordt specifieke processen, zoals moleculaire beweging (diffusie) en structuurveranderingen in eiwitten, die teveel in aantal zijn en te microscopisch, zodat we hen niet kunnen meten. We weten dus niet wanneer en hoe zij zich voordoen waardoor het preciese moment van aanmaak en afbraak reacties voor ons onbekend is, we kunnen alleen hun kansen bepalen. Zie: Gillespie DT., *Stochastic simulation of chemical kinetics.*, Annu Rev Phys Chem. 2007;58:35-55.

³⁵"I think in the next twenty-five years we are going to have to teach biologists another language . . . I don't know what it's called yet; nobody knows. But what one is aiming at, I think, is the fundamental problem of the theory of elaborate systems . . . - And here there is a grave problem of levels: it may be wrong to believe that all the logic is at the molecular level." (Sydney Brenner)

³⁶Denk aan onze begrip van fase overgangen, de brede toepasbaarheid van Ising modellen en andere thermodynamische en statistisch fysische concepten.

³⁷Zie: <http://www.nature.com/nrm/journal/v7/n11/full/nrm2023.html> en <http://www.sciencemag.org/content/303/5659/781>.

³⁸Dit zijn veelal geen formele reducties, volgens eenduidelijke wiskundige principes, maar is meer gebaseerd op een intuïtief begrip van de werking van een specifiek, complex systeem.

³⁹Wortel, M. T., Peters, H., Hulshof, J., Teusink, B., Bruggeman, F. J. Metabolic states with maximal specific rate carry flux through an elementary flux mode. *FEBS Journal* (2014). doi:10.1111/febs.12722

⁴⁰Berkhout, J., Bosdriesz, Nikerel, E., Molenaar, D., de Ridder, D., Teusink, B., Bruggeman, FJ, How biochemical constraints of cellular growth shape evolutionary adaptations in metabolism. *Genetics* 194, 505?512 (2013).

⁴¹Jensen, P. R., Michelsen, O., Westerhoff, H. V. Control analysis of the dependence of *Escherichia coli* physiology on the H(+)-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8068?8072 (1993).

⁴²Scott, M., Gunderson, C. W., Mateescu, E. M., Zhang, Z., Hwa, T. Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. *Science* 330, 1099?1102 (2010).

⁴³Berkhout, J., Teusink, B., Bruggeman, F. J. Gene network requirements for regulation of metabolic gene expression to a desired state. *Sci Rep* 3, 1417 (2013).

⁴⁴Als je dit doet dan vind je:

$$\begin{aligned}x_o(s) &= \frac{-s + \sqrt{ks^2(1+s)}}{k + ks - 1} \\e_o(s) &= e_T \frac{ks(1+s) - \sqrt{ks^2(1+s)}}{s(k + ks - 1)},\end{aligned}$$

dit is voldoende om al de andere relaties af te leiden.

⁴⁵Kaspy, I. et al. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat Commun* 4, 3001 (2013).

⁴⁶Ryals, J., Little, R., Bremer, H. Control of rRNA and tRNA syntheses in *Escherichia coli* by guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.* 151, 1261?1268 (1982).

⁴⁷Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., Gerdes, K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* 154, 1140?1150 (2013).

⁴⁸Kaspy, I. et al. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat Commun* 4, 3001 (2013).

⁴⁹Balaban, N. Q. et al., Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science* 305, 1622?1625 (2004).